

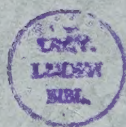
TOLERANZENTWICKLUNG BEI HERZWIRKSAMEN PHARMAKA

Untersuchungen am Herzglykosid-Rezeptor
und Beta-Adrenozeptor
kultivierter Hühner-Herzzellen

Christopher Reithmann

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik I der Universität München

Klinikum Großhadern

Vorstand: Prof. Dr. med. G. Riecker

TOLERANZENTWICKLUNG BEI HERZWIRKSAMEN PHARMAKA

Untersuchungen am Herzglykosid-Rezeptor und Beta-Adrenozeptor
kultivierter Hühner-Herzzellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christopher Reithmann

aus

Köln

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: 1. Priv. Doz. Dr. K. Werdan
 2. Prof. Dr. H.-G. Zimmer

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. G. Riecker
 2. Prof. Dr. H. Kurz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.87

MEINEN ELTERN

UND HANNI

<u>1. Einleitung</u>	4
1.1. Toleranzentwicklung bei herzwirksamen Pharmaka	4
1.1.1. Toleranz bei Herzglykosidmedikation	4
1.1.2. Toleranzphänomene bei Gabe von Beta-Rezeptorenblockern	5
1.2. Kultivierte Hühner-Herzzellen als Modell der experimentellen Kardiologie	7
1.2.1. Eigenschaften der Herzzellkulturen	7
1.2.2. Herzglykosid-Rezeptoren kultivierter Herzmuskelzellen	8
1.2.3. Beta-Adrenozeptoren kultivierter Herzzellen	9
1.3. Fragestellung und Zielsetzung	9
 <u>2. Materialien und Methoden</u>	 11
2.1. Materialien	11
2.2. Inkubationslösungen	12
2.3. Präparation und Kultivierung von Hühner-Herzzellen	12
2.3.1. Präparation der Herzmuskelzellkulturen	13
2.3.2. Präparation der Herzbindegewebszellkulturen	15
2.3.3. Langzeitzüchtung kultivierter Herzzellen	15
2.4. Messung der spezifischen (^3H)Strophanthin-Bindung	19
2.5. Messung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx	20
2.6. Messung des zellulären Kalium-, Natrium- und Proteingehaltes	20
2.7. Messung der spezifischen (^3H)(-)CGP 12177-Bindung	21
2.8. Messung der cAMP-Bildung	22
2.9. Messung der Kontraktilität	24
2.10. Messung des zellulären ATP-Gehaltes	28
2.11. Messung des Proteingehaltes der Zellen	30

<u>3. Ergebnisse</u>	31
3.1. Toleranzentwicklung bei Herzglykosid-Exposition in Hühner-Herzmuskelzellen	31
3.1.1. Charakterisierung der Herzglykosid-Rezeptoren	31
3.1.2. Nachweis der Toleranzentwicklung	36
3.1.3. Mechanismus der Herzglykosid-Toleranz	40
3.1.4. Regulation der Beta-Adrenozeptoren bei der Herzglykosid-Toleranz	44
3.1.5. Quantitative Aspekte der Herzglykosid-Toleranz	46
3.2. Betablocker-Absetzphänomen in Hühner-Herzzellen	50
3.2.1. Charakterisierung der Beta-Adrenozeptoren	50
3.2.2. Regulation der Beta-Adrenozeptoren durch (-)Noradrenalin	53
3.2.3. Betablocker-Absetzphänomen im Noradrenalin-freiem Zellkultursystem	60
3.2.4. Bedeutung von Noradrenalin beim Betablocker-Absetzphänomen	65
3.2.5. Selektive Beta ₁ - und Beta ₂ -Adrenozeptor-Regulation durch Betablocker	68
<u>4. Diskussion</u>	72
4.1. Herzglykosid-Toleranz	72
4.1.1. Herzglykosid-Rezeptoren kultivierter Herzmuskelzellen	72
4.1.2. Herzglykosid-Toleranz in kultivierten Hühner-Herzzellen	73
4.1.3. Vergleich tierexperimenteller- und Zellkulturstudien bei der Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden	75
4.1.4. Vergleich der an Zellkulturen erhaltenen Befunde mit klinischen Studien bei der Langzeit-Digitalistherapie herzinsuffizienter Patienten mit Sinusrhythmus	76
4.1.5. Klinische Schlußfolgerungen	78
4.2. Betablocker-Absetzphänomen	80
4.2.1. Beta-Adrenozeptoren kultivierter Herzmuskelzellen	80
4.2.2. Beta-Adrenozeptor-Desensibilisierung	81

4.2.3. Betablocker-Absetzphänomen in kultivierten Herzzellen	82
4.2.4. Bedeutung des Noradrenalins beim Betablocker-Absetzphänomen	84
4.2.5. Beta ₂ - "Pseudo-Selektivität" der ISA	86
4.2.6. Klinische Schlußfolgerungen	87
4.3. Toleranzmechanismen in kultivierten Herzzellen	90
4.3.1. Rezeptorregulation als Prinzip der Toleranzentwicklung	90
4.3.2. Möglichkeiten therapeutischen Eingreifens zur Verhinderung einer Toleranzentwicklung	91
<u>5. Zusammenfassung</u>	93
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	97

1. EINLEITUNG

1.1. Toleranzentwicklung bei herzwirksamen Pharmaka

Toleranzphänomene bei der Behandlung mit Arzneimitteln, d.h. Abschwächung der Pharmakonwirkung oder Auftreten von Absetzphänomenen nach plötzlichem Pharmakonentzug, stellen klinisch relevante Probleme bei der Behandlung mit vielen Medikamenten dar (7,84,87,88,104, 137,156). Bei herz- und kreislauf-wirksamen Medikamenten hat die Toleranzentwicklung Bedeutung z.B. bei Vasodilatoren (90), Nitraten (133) und Katecholaminen (63).

Der Großteil herzwirksamer Pharmaka entfaltet seine Wirkung über spezifische Rezeptoren der Zellmembran. Inotrope Wirkungen werden hauptsächlich über Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren vermittelt. Auch an diesen beiden Rezeptoren sind Toleranzmechanismen bekannt bzw. werden zumindest diskutiert: So wird die Wirkung von Katecholaminen innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen abgeschwächt (25,63); bei der Behandlung mit Beta-Rezeptorenblockern kann es nach plötzlichem Betablocker-Entzug zu einem Absetzphänomen kommen (102,143,144); bei der Langzeitmedikation herzwirksamer Glykoside wird eine Abschwächung der Herzglykosidwirkung diskutiert (42,66,67,175).

Die molekularen Mechanismen einer Toleranzentwicklung sind in klinischen Versuchen und in Tierexperimenten häufig nur schwer zu untersuchen. Als alternative Möglichkeit bietet sich das experimentelle Modell kultivierter Herzzellen an. In diesem Untersuchungsobjekt lassen sich die einzelnen Schritte der Pharmakonwirkungen und die Regulationsmechanismen der Zelle ohne humorale oder nervale Einflüsse in überschaubarer Weise messen (194).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Mechanismen der Toleranz-entwicklung herzwirksamer Pharmaka am Beispiel von Herzglykosiden und Beta-Rezeptorenblockern in kultivierten Herzzellen zu untersuchen.

1.1.1. Toleranz bei Herzglykosidmedikation

Herzglykoside sind in der Behandlung von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und supraventrikulären Tachyarrhythmien anerkannt (9,55-59,62). Sie steigern beim chronisch herzinsuffizienten Patienten die Kontraktionskraft



des Herzens sowie das Herzminutenvolumen. Ihre therapeutisch günstige Wirkung beim Vorhofflimmern mit schneller Überleitung beruht im Wesentlichen auf ihrer AV-blockierenden Wirkung mit konsekutiver Abnahme der Kammerfrequenz (55,56,123,148).

Der Herzglykosid-Rezeptor ist Teil der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, eines Enzyms, welches für den aktiven Na^+ und K^+ -Transport über die Zellmembran verantwortlich ist und durch die Bindung der Herzglykoside gehemmt wird (49-52,158,178). Die positiv inotrope Herzglykosidwirkung wird allgemein mit der Enzymhemmung in Zusammenhang gebracht (3,4,54,60,73-76,105-107,146,147,154): Die partielle Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase bewirkt eine geringe intrazelluläre Anreicherung an Na^+ (109,174). Durch Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Gegenaustausches kommt es dadurch zu einem Anstieg des intrazellulären, ionisierten Calciums, welches die positiv inotrope Wirkung vermittelt.

Die Frage, ob es bei Langzeitbehandlung der chronischen Herzinsuffizienz mit herzwirksamen Glykosiden zu einer Toleranzentwicklung kommt, ist bislang ungeklärt. In klinischen Studien wurde sowohl über eine Abschwächung der Glykosidwirkung (42,66,67,175) als auch über eine unveränderte Wirksamkeit berichtet (9,44,65,110,167). Die Beurteilung dieser Studien ist aber meist durch die unterschiedliche Ätiologie der Erkrankung, die der Herzinsuffizienz zugrunde liegt, und durch den Einsatz zusätzlicher Pharmaka erschwert (z.B. Diuretika, Vasodilatoren). Ebenso erbrachten auch tierexperimentelle Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse über das Auftreten einer Änderung der Digitalisempfindlichkeit bei Langzeitmedikation (16,21,103,132).

1.1.2. Toleranzphänomene bei Gabe von Beta-Rezeptorenblockern

Beta-Rezeptorenblocker sind ein wichtiger Bestandteil in der Therapie der Hypertonie und der Angina pectoris, in der Behandlung von Arrhythmien und in der Sekundärprophylaxe des Reinfarktes (20,70,90). Durch die Blockade der Beta-Adrenozeptoren reduzieren sie die beta-sympathomimetisch ausgelöste Steigerung der Schlagfrequenz und der Kontraktilität der Herzmuskelzelle. Dadurch verhindern sie bei Patienten mit Koronarinsuffizienz einen kritischen Anstieg des

myokardialen Sauerstoffverbrauchs. Auch die antiarrhythmische Wirkung von Beta-Rezeptorenblockern wird in erster Linie auf die Blockade der Beta-Adrenozeptoren zurückgeführt (139).

Beta-Adrenozeptoren lassen sich einteilen nach ihren pharmakologischen Eigenschaften in Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren, nach ihrer Lokalisation im synaptischen Spalt in prä- und postsynaptische Beta-Adrenozeptoren und nach ihrer Lokalisation in periphere und zentrale Beta-Adrenozeptoren (77). Die Klassifizierung der Beta-Rezeptorenblocker erfolgt vorwiegend nach ihrer Beta_1 -Selektivität (z.B. Metoprolol), nach ihrer intrinsischen sympathomimetischen Aktivität (ISA, z.B. Pindolol) und nach ihrer membranstabilisierenden Wirkung (z.B. Propranolol) (90).

Ein Wirkungsverlust der Beta-Rezeptorenblocker während der Therapie spielt keine oder nur eine minimale Rolle. Hingegen haben kasuistische Mitteilungen über das Auftreten von Angina pectoris, Myokardinfarkt, schwerwiegenden ventrikulären Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod nach plötzlichem Absetzen einer Dauertherapie mit Beta-Rezeptorenblockern bei kardial gefährdeten Patienten das Interesse auf diese Entzugsphänomene nach chronischer Betablockade gerichtet (6,43,127,159).

Als zugrundeliegender Mechanismus des Betablocker-Absetzphänomens wird in erster Linie eine gesteigerte Empfindlichkeit des Herzens gegenüber endogenen Katecholaminen diskutiert, die mit einer Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren während der Betablockade erklärt wird (102,130,143). Als weitere mögliche Ursachen werden Thrombozytenhyperkoagulabilität, erhöhte Produktion von Trijodthyronin, erhöhte Reninfreisetzung und Linksverschiebung der HbO_2 -Bindungskurve diskutiert (102,143).

Die Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren während der Betablockade soll dadurch zustande kommen, daß die physiologische, durch endogene Katecholamine hervorgerufene Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren verhindert wird (68). Ob das Auftreten eines Absetzphänomens durch Verwendung von Betablockern mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität verhindert werden kann, wird unterschiedlich beurteilt (27,102,128,143). Während aus Studien an

Beta₂-Adrenozeptoren menschlicher Lymphozyten der Schluß gezogen wurde, daß partielle Agonisten eine Zunahme der Beta-Adrenozeptoren verhindern könnten (27,126,128), wurde in klinischen Untersuchungen auch über Absetzphänomene nach Entzug von Betablockern mit ISA berichtet (144,170,199). Auch die Bedeutung der Subtypen Beta₁ und Beta₂ beim Betablocker-Absetzphänomen ist noch weitgehend ungeklärt (39,102,144).

1.2.Kultivierte Hühner-Herzzellen als Modell der experimentellen Kardiologie

1.2.1. Eigenschaften der Herzzellkulturen

Toleranzmechanismen an Beta-Adrenozeptoren und Herzglykosid-Rezeptoren sind in einer Vielzahl von klinischen Studien und Tierexperimenten beschrieben bzw. diskutiert worden. Bei Untersuchungen an Patienten wird dabei häufig die Messung von Rezeptorveränderungen an Blutzellen (z.B. Lymphozyten, Erythrozyten) als Modell der Toleranzentwicklung am Herzen verwendet (27,61,71).

Im Hinblick auf die vorliegende Fragestellung bieten aber Herzmuskelzellkulturen als Untersuchungsobjekt erhebliche Vorteile (46,112,152,194): Bei Zugabe eines Pharmakons zum Inkubationsmedium lassen sich unter Konstanzhaltung der sonstigen Züchtungsbedingungen Ausmaß, zeitlicher Ablauf und Mechanismus der Toleranzentwicklung untersuchen. Die Auswirkungen auf Kontraktionsverhalten, Rezeptorveränderungen und Stoffwechsel können auf der Ebene der Einzelzelle untersucht werden.

Durch die Bedingungen der Präparation (Trypsininierung, Zentrifugation) entstehen nur reversible funktionelle und morphologische Veränderungen (125,152,164,165). Das Fehlen neuronaler Strukturen (46,161) verhindert weitgehend eine unkontrollierte Freisetzung adrenerger oder cholinерger Neurotransmitter, was am intakten Gewebeverband Untersuchungen an Adrenozeptoren stark erschwert. Durch das Fehlen von Diffusionsbarrieren und das Vorhandensein eines nur kleinen, gut kontrollierbaren Interzellulärtraumes (12) sind Experimente in einem exakt definierten biochemischen System möglich. Da Regulationsmechanismen in Muskel- und Bindegewebszellen unterschiedlich und sogar gegensinnig verlaufen können (145,186,188,194,195), kommt der Trennung der Herzmuskelzellen von den zu ca. 70%

im Herzen vorhandenen Bindegewebszellen (Endothel-, Epithelzellen, Fibroblasten) (122) besondere Bedeutung zu.

Herzzellkulturen von Hühnerembryonen stellen dabei eines der am besten untersuchten Systeme kultivierter Herzzellen dar (18,19,64,85,93,100,101, 118-121,163-165,185,186,188-195). Im Folgenden sollen nun die bisher bekannten Ergebnisse über Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren in kultivierten Herzmuskelzellen kurz dargestellt werden.

1.2.2. Herzglykosid-Rezeptoren kultivierter Herzmuskelzellen

Die Herzglykosid-Rezeptoren kultivierter Herzmuskelzellen sind kürzlich von mehreren Arbeitsgruppen charakterisiert worden (2,69,94,95,124,185-187,191). Während von der Mehrzahl der Autoren in Hühner-Herzmuskelzellen die Existenz einer einheitlichen Klasse von Bindungsstellen berichtet wurde (95,185,186,191), wurden in Herzmuskelzellkulturen von neonatalen Ratten eine hoch- und eine niederaffine Klasse von Herzglykosid-Rezeptoren beschrieben (187).

Die Bindung des Herzglykosids an den Rezeptor führt zur Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports über die Zellmembran (10,14,69,95,124,185-187, 191-193) sowie zur Aktivierung eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystems, welches vermehrt Kalziumionen in die Zellen transportiert (94). Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität dieser Zellen kann ebenfalls durch Herzglykoside gehemmt werden (163-165,186,187).

Herzglykoside steigern die Kontraktionsfrequenz kultivierter Herzmuskelzellen (101,136), wie dies auch für das denervierte Sinusknotenpräparat des adulten Säugetierherzens bekannt ist (56), und rufen in hohen Konzentrationen toxische Effekte (Arrhythmien) hervor (101,191-193). Im gleichen Konzentrationsbereich steigern sie die Pulsationsamplitude und die Kontraktionsgeschwindigkeit der Zellen (10,187,191), was einer positiv inotropen Wirkung entspricht (86). Der beschriebene Wirkungsmechanismus der Herzglykoside hat somit auch in kultivierten Herzmuskelzellen Gültigkeit.

1.2.3. Beta-Adrenozeptoren kultivierter Herzzellen

Die Beta-Adrenozeptoren kultivierter Herzmuskelzellen von Hühnerembryonen und neonatalen Ratten wurden übereinstimmend als einheitliche Klasse von Beta₁-Adrenozeptoren klassifiziert (32,91,108,120,145). Dagegen besitzen die "Nichtmuskelzellen" des Herzens (Endothelzellen und Fibroblasten) (122) im Wesentlichen Beta₂-Adrenozeptoren (32,108,145). Die Bindung von Agonisten an Beta-Adrenozeptoren intakter Herzzellen führt zur Bildung von zyklischem AMP (13,18,19,120,142,145) und in Herzmuskelzellen zur Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit (120,145). Über die positiv chronotrope Wirkung des Agonisten Isoproterenol in kultivierten Herzmuskelzellen sind kontroverse Ergebnisse berichtet worden. Während einerseits positiv chronotrope Effekte nachgewiesen wurden (179,180), konnte dies von anderen Autoren nicht bestätigt werden (101,118,145).

Die Mechanismen der Desensibilisierung des Beta-Adrenozeptor-Adenylatzyklase-Systems in Herzmuskelzellen sind von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden (13,18,19,91,113,118,121,142). Dabei lassen sich zwei Schritte unterscheiden: Durch die Bindung des Agonisten kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Änderung der Bindungskonformation von einer hoch- in eine niederaffine Form (118,120). Inkubation in Gegenwart des Agonisten für Stunden oder Tage führt darüberhinaus zu einer Abnahme der Rezeptordichte der Herzzellen durch Internalisierung der Rezeptoren (13,18,19,91,113,118,121,142).

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Problem der Toleranzentwicklung bei Gabe von Herzglykosiden und Beta-Rezeptorenblockern am Modell kultivierter Hühner-Herzzellen untersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Gibt es bei der Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden eine Toleranzentwicklung? Wenn ja, welche sind die zugrundeliegenden Mechanismen, und was ist ihre klinische Bedeutung?
2. Läßt sich in Hühner-Herzmuskelzellen ein Betablocker-Absetzphänomen nachweisen? Welche Bedeutung kommt bei diesem Phänomen den endogenen

Katecholaminen zu? Läßt sich ein Betablocker-Absetzphänomen durch Betablocker mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität verhindern?

Welche Rolle spielen Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptor-Subtypen?

Die Untersuchung der Gewöhnungsmechanismen am Herzglykosid-Rezeptor und Beta-Adrenozeptor kultivierter Hühner-Herzzellen sollte Mechanismen der Toleranzentwicklung herzwirksamer Pharmaka und Möglichkeiten ihrer therapeutischen Beeinflußbarkeit aufzeigen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Radiochemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Buchler, D-3300 Braunschweig: (^3H)(+)CGP 12177 (41 Ci/mmol); (^3H)(-)CGP 12177 (44 Ci/mmol); (^3H)cAMP assay kit;

NEN Chemicals, D-6072 Dreieich: $^{22}\text{NaCl}$, carrier-free; $^{86}\text{RbCl}$ (0,9-4,6 mCi/mg); (^3H)-Strophanthin (14-20 Ci/mmol);

Biochrom, D-1000 Berlin: Collagenase "Worthington", 125-250 U/mg; CLS II; fötales Kälberserum; Pferdeserum; CMRL 1415 ATM Medium;

Boehringer, D-6900 Mannheim: eisen-gesättigtes Transferrin, No.652202;

Sigma Chemie, D-8072 Taufkirchen: Rinder-Insulin, 24 I.U./mg, No.I 15500;

Timolol Maleat, No. T 6394; Luciferase-Luciferin, No. L 1761; Dexamethason, No. D 8893; (-)Noradrenalin, Nr. A 7381; (+)Isoproterenol, Nr. I 5627; IBMX (Isobutyl-methyl-xanthin), No. I 5879;

Serva Biochemica, D-6900 Heidelberg: Trypsin 1:250, No. 37290; Rinderalbumin, Nr. 11920; HEPES (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure);

Roth, D-7500 Karlsruhe: Cycloheximid;

ICN Pharmaceuticals, D-3340 Eschwege: aluminium oxide W 200 neutral for column chromatography;

BIORAD Laboratories, Richmond, USA: Dowex AG 50 WX 4 cation exchange resin (200-400 mesh, hydrogen form).

Byk-Essex, D-8000 München: Gentamycin (Sulmycin^R).

Die folgenden Substanzen wurden uns freundlicherweise von den genannten Firmen zur Verfügung gestellt:

(+), (+) und (-)CGP 12177 (4-(3-t-butylamino-2-hydroxypropoxy)-

benzimidazol-2-on) von CIBA GEIGY (Basel, Schweiz); ICI 118551, (-) und

(+)Propranolol von ICI Pharma (Macclesfield, Great Britain); (-)Pindolol von Sandoz (D-8500 Nürnberg).

Alle anderen Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, D-6100 Darmstadt; Boehringer-Mannheim, D-6800 Mannheim; Serva Biochemica, D-6900 Heidelberg.

2.2. Inkubationslösungen

a) Wachstums-Medium: CMRL 1415 ATM Medium (83); pH 7,40; für Muskelzellkulturen ergänzt mit 10% Pferdeserum, 10% fötalem Kälberserum und 0,02 mg/ml Gentamycin; für Bindegewebszellkulturen ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum und 0,05 mg/ml Gentamycin.

b) Serumhaltiges Züchtungsmedium: CMRL 1415 ATM Medium; pH 7,40; ergänzt mit 5% Pferdeserum und 5% fötalem Kälberserum; $[K^+] = 3,5 \text{ mM}$.

c) Serumhaltiges Inkubationsmedium: CMRL 1415 ATM Medium; 20 mM HEPES; pH 7,40; ergänzt mit 2,5% Pferdeserum und 2,5% fötalem Kälberserum; $[K^+] = 0,75 \text{ mM}$ oder $3,5 \text{ mM}$.

d) Serumfreies Medium: CMRL 1415 ATM Medium; pH 7,40; ergänzt mit $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ Insulin + 10^{-7} M Dexamethason + $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ eisen-gesättigtem Transferrin + $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ Rinderalbumin (38); $[K^+] = 0,75 \text{ mM}$ oder $3,5 \text{ mM}$.

e) CMRL-Salzlösung: CMRL 1415 ATM Medium; 20 mM HEPES; pH 7,40; erniedrigtes $[Ca^{2+}] = 0,6\text{--}1,2 \text{ mM}$.

f) Wasch-Tyrode: NaCl 135 mM; KCl 0,75 mM oder 3,5 mM; $CaCl_2$ 1,8 mM; $MgCl_2$ 1,05 mM; NaH_2PO_4 0,36 mM; D-Glucose 5 mM; HEPES 5 mM; pH 7,25.

g) Stopp-Lösung: $CaCl_2$ 1,8 mM; Sorbit 280 mM; pH 7,40.

h) PBSAG: " Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Phosphate-Buffered-Saline A + Glucose" (81) mit folgender Zusammensetzung: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0,6 mM; KH_2PO_4 2,1 mM; pH 7,40.

i) Detergenz: 0,1 M NaOH + 4,5 mM EDTA.

2.3. Präparation und Kultivierung von Hühner-Herzzellen (12,81,193-197,194,195)

Die Präparation wurde - in leicht modifizierter Form - nach der von Harary (81) beschriebenen Technik durchgeführt. Durch Langzeitinkubation der Zellen in

definierten Kulturmedien war es möglich, Toleranzmechanismen in Hühner-Herzzellen zu untersuchen.

2.3.1. Präparation der Herzmuskelzellkulturen (Abb.1)

100-200 Hühnerembryonen (11-13 Tage alt) werden dekapitiert. Unter sterilen Bedingungen (Laminar flow) werden die noch schlagenden Herzen aus den Situs freipräpariert und in eiskalter (4°C) PBSAG-Lösung gesammelt. Anschließend werden die Herzen in kleine Stücke (Kantenlänge 1mm) geschnitten. Durch fraktionierte enzymatische Behandlung in einem in PBSAG gelösten Trypsin (0,12%)–Collagenase (0,03%)–Gemisch (Einwirkdauer je 15min bei 37°C) werden die Zellen aus dem Zellverband gelöst. Die bei den ersten 2-3 Trypsinierungsschritten erhaltenen Zellsuspensionen werden verworfen, da sie hauptsächlich Zell-Debris, Erythrozyten und Bindegewebszellen enthalten (15). Bei den weiteren 5-8 Trypsinierungsschritten werden die Überstände (jeweils 15-20ml) abpipettiert und in Zentrifugenröhrchen gesammelt, die jeweils 1ml eiskaltes, steriles CMRL-Wachstumsmedium enthalten. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wird durch den Serumanteil des Wachstumsmediums aufgehoben.

Die erhaltenen Zellsuspensionen werden für 10min bei 300g zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Sediment wird wieder in Suspension (CMRL Züchtungsmedium, 37°C) gebracht. Das von Blondel (15) beschriebene Verfahren "Differential Attachment Technique" (DAT) erlaubt nun eine Trennung der in der Suspension vorhandenen Muskel- und Bindegewebszellen. Sie beruht auf der unterschiedlichen Absetzgeschwindigkeit der beiden Zellarten in flüssigem Inkubationsmedium: Die Zellsuspension wird in mehrere 75cm^2 Plastik-Kulturfläschchen (Nunclon Plastics, DK-Roskilde) gegeben und für 90-120min bei 37°C inkubiert (Heinicke-Napco-Brutschrank, Wasserdampf gesättigte Atmosphäre). Die Bindegewebszellen wachsen in dieser Zeit zum Großteil am Boden des Kulturfläschchens an, während die Muskelzellen in Suspension verbleiben. Die Myozyten werden abpipettiert, ihre Gesamtausbeute mit Hilfe eines Häemocytometers unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelt und durch Zugabe von Wachstumsmedium entsprechend einer gewünschten Zellkonzentration weiter verdünnt. Anschließend

PRÄPARATION VON HERZMUSKELZELLEN

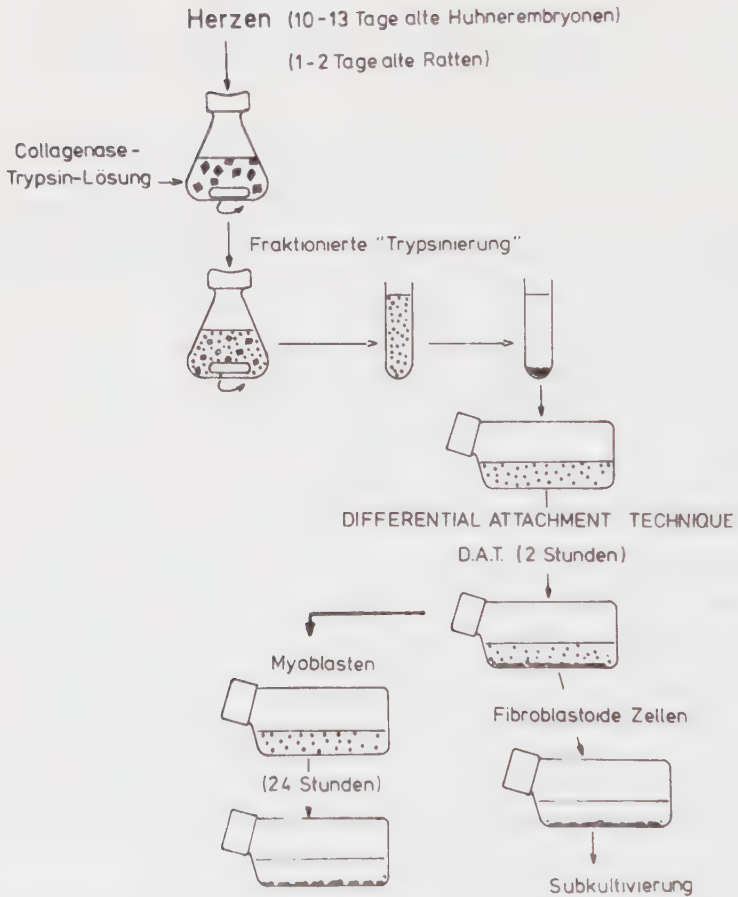


Abb.1

Schema: Präparation und Kultivierung von Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen von Hühnerembryonen (siehe 194).

wird die erhaltene Zellsuspension auf 25cm^2 Plastik-Kulturfläschchen verteilt und weiter bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die hohe Pufferkapazität des Wachstumsmediums erübrigt sich bei geschlossenen Kulturfläschchen eine CO_2 -Begasung (83). Die Herzmuskelzellen gewinnen nach 12-24 Stunden festen Bodenkontakt und beginnen nach 24-48 Stunden spontan zu schlagen. Abb.2a zeigt eine Herzmuskelzellkultur 48 Stunden nach der Präparation.

2.3.2. Präparation der Herzbindegewebszellkulturen

Die Bindegewebszellen werden in CMRL-Züchtungsmedium ohne Zusatz von Pferdeserum (siehe 2.2.) für 2-4 Tage gezüchtet und anschließend einer Subkultivierung unterworfen. Dazu werden die Zellen durch Zugabe von 0,02% EDTA + 0,05% Trypsin (in PBSAG gelöst, 15min) abtrypsiniert, zentrifugiert, in Züchtungsmedium suspendiert und im Verhältnis 1:2-1:3 auf 25cm^2 Plastik-Kulturfläschchen ausgesät. In Abb.2b ist eine Herzbindegewebszellkultur abgebildet.

2.3.3. Langzeitzüchtung kultivierter Herzzellen

Die Experimente zur Charakterisierung von Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren wurden in den Muskelzellkulturen 2 Tage nach Präparation und in den Bindegewebszellen 2-3 Tage nach Subkultivierung durchgeführt.

Zur Untersuchung der Toleranzmechanismen wurde das Wachstumsmedium 24 Stunden nach Präparation (Muskelzellen) bzw. 24-72 Stunden nach Subkultivierung (Bindegewebszellen) unter sterilen Bedingungen abgesaugt und durch Züchtungsmedium ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 3 Tage bei täglichem sterilen Mediumwechsel kultiviert; die Durchführung der Experimente erfolgte in der Regel am 4. Züchtungstag. Folgende Züchtungsmedien wurden verwendet (siehe 2.2.):

- a) serumhaltiges Züchtungsmedium
- b) serumfreies Züchtungsmedium (38)

Da die Muskelzellkulturen zu etwa 10% mit Bindegewebszellen verunreinigt sind, die im Gegensatz zu den nicht teilungsfähigen Myozyten eine hohe Proliferationskapazität besitzen, ist es notwendig, das Fibroblastenwachstum zu

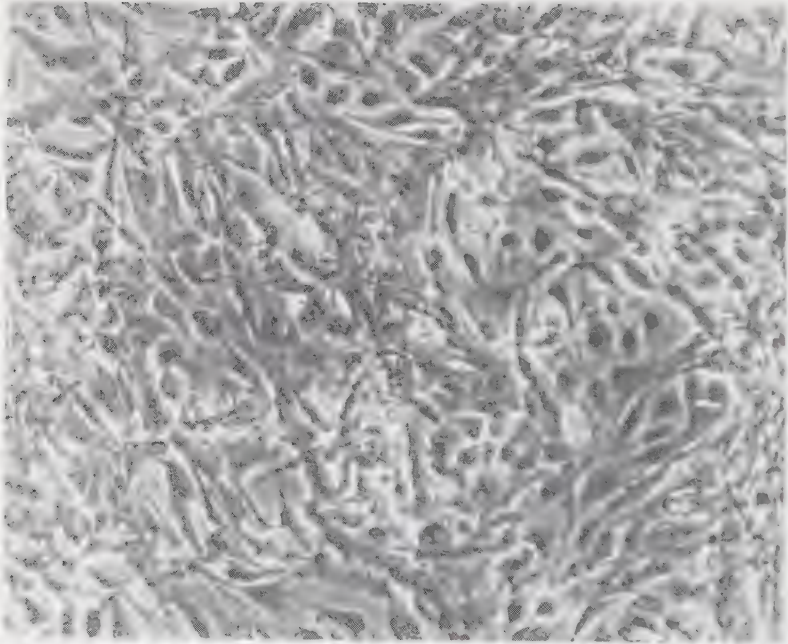


Abb.2a

Hühner-Herzmuskelzellen in Kultur; 48 Stunden nach der Aussaat; Phasenkontrastmikroskop;
200-fache Vergrößerung.

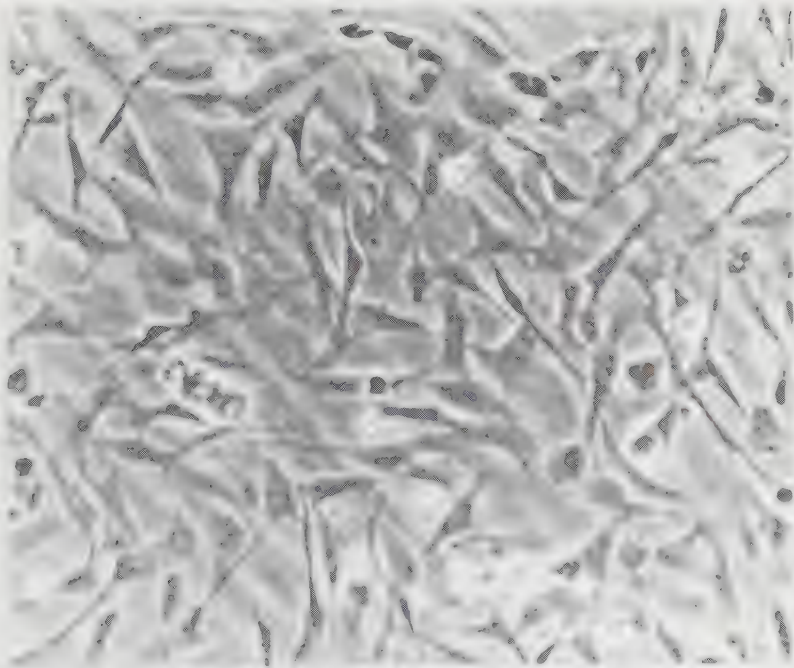


Abb. 2b

Hühner-Herzbindegewebszellen in Kultur; 24 Stunden nach der Aussaat;
Phasenkontrastmikroskop; 300-fache Vergrößerung.

bremsen. Dies gelingt teilweise im serumhaltigen Züchtungsmedium, das nur niedrige Serumkonzentrationen enthält, jedoch fast vollständig im serumfreien Züchtungsmedium. Der Proteingehalt pro Fläschchen steigt während der dreitägigen Züchtungsperiode in serumhaltigem Medium um 90%, in serumfreiem Medium jedoch nur um 3% an. Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß weder Bindungsergebnisse noch funktionelle Parameter (Ionenflüsse, Kontraktilitätsparameter) in den beiden Systemen Unterschiede aufwiesen. Die Herzzellen können in serumfreiem Medium jedoch nur etwa eine Woche, in serumhaltigem dagegen mehrere Wochen in Kultur gehalten werden.

Die von uns bevorzugte serumfreie Züchtung ermöglichte es uns, während der gesamten Kultivierungsperiode von 5 Tagen Muskelzellkulturen mit einem Reinheitsgrad >75% zur Verfügung zu haben. Auch dichte Bindegewebszellkulturen (>0,5mg Protein pro Fläschchen) lassen sich problemlos in serumfreiem Medium kultivieren.

Um die Langzeitgabe von Herzglykosiden und die Beta-Rezeptorenblockade bei verschiedenen Plasmakonzentrationen endogener Katecholamine nachzuahmen, wurden dem Züchtungsmedium g-Strophanthin bzw. Betablocker (Propranolol, Timolol, Pindolol) und Noradrenalin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Es konnte durch Messungen im Kulturmedium (HPLC mit fluorimetrischer Detektion) gezeigt werden, daß der Verlust an Noradrenalin im serumfreien Medium in Gegenwart von 1 mM Ascorbinsäure bei täglichem Mediumwechsel innerhalb von 72 Stunden weniger als 20% beträgt. Nach der dreitägigen Züchtungsperiode wurden die Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen 5 mal mit Waschtirode gespült und anschließend für 120min in Kontrollmedium inkubiert, um die zellgebundenen Liganden zu entfernen (alle Vorgänge bei 37°C). Durch diese Waschprozedur gelang es, zellgebundenes g-Strophanthin zu mehr als 90% und zellgebundene Beta-Rezeptorenblocker zu mehr als 95% zu entfernen. Dies konnte durch folgende Experimente gezeigt werden, die die Dissoziation der Liganden während der Waschperiode abzuschätzen erlauben: die Zellen werden für 2 Stunden mit den für die dreitägige Züchtung verwendeten Lösungen inkubiert und der oben beschriebenen zweistündigen Waschprozedur unterzogen. Durch anschließende spezifische (³H)Strophanthin- bzw.

(^3H)(-)CGP 12177 Bindung (siehe 2.4.,2.7.) kann im Vergleich mit Kontrollzellen der Anteil noch besetzter Herzglykosid-Rezeptoren bzw. Beta-Adrenozeptoren berechnet werden.

2.4. Messung der spezifischen (^3H) Strophanthin-Bindung (185-187,194,195)

Die Bindungsexperimente wurden bei 37°C in 25cm^2 Nunclon-Plastikfläschchen durchgeführt. Bei den Langzeitexperimenten (dreitägige Züchtung) erfolgten die Messungen im Anschluß an die oben beschriebene Waschprozedur. Die Herzzellen wurden zunächst zweimal mit 4ml Waschtzyrode (2.2.) bei 37°C gespült und anschließend in serumhaltigem Inkubationsmedium oder in serumfreiem Medium inkubiert (Inkubationsvolumen 4,1ml). Die Bestimmung der (^3H)Strophanthin-Bindung wurde bei einer K^+ -Konzentration von 0,75 mM in Gegenwart von $6 \times 10^{-8}\text{M}$ (^3H)Strophanthin (ca. 4×10^6 cpm) durchgeführt. Zur Messung der konzentrationsabhängigen (^3H)Strophanthin-Bindung wurden eine konstante Menge (^3H)Strophanthin und gleichzeitig steigende Mengen an nicht markiertem Strophanthin (Endkonzentration $1,5 \times 10^{-8}\text{M}$ – 10^{-5}M) zugesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von 10^{-4}M Strophanthin ermittelt. Der Bindungsvorgang wurde gestoppt durch fünfmaliges Spülen der Kultur mit 5ml eiskalter Ca^{2+} -Sorbit-Lösung. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1,3ml Detergenz (2.2.) aufgelöst. 700–1000 μl davon wurden mit 1 M HCl neutralisiert und mit 10ml Unisolve (Fa. Zinsser, Frankfurt) versetzt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler der Fa. Berthold-Frieseke (München). $2 \times 50 \mu\text{l}$ wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry (115), $2 \times 200 \mu\text{l}$ für die Messung des Zell-Kaliums entnommen. Die Berechnung der spezifischen (^3H)Strophanthin-Bindung erfolgte durch Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtbindung. Dissoziationskonstanten der Bindung und maximale Bindungskapazität wurden aus der Auftragung nach Scatchard (151) mittels linearer Regression berechnet.

2.5. Messung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx

Die Messung des aktiven, transmembranären Kaliumtransportes kann mit dem Kaliumanalogon $^{86}\text{Rb}^+$ (Radioaktivitätshalbwertszeit: 18,7 Tage) anstelle von $^{42}\text{K}^+$ (T_{1/2}: 12,5 Stunden) durchgeführt werden. Beide Kationen werden mit vergleichbaren Transportraten in die Zellen aufgenommen (12,183-187, 194,195,200). Die Zellkulturen wurden in 4,0ml serumhaltigen oder serumfreiem Inkubationsmedium für 4 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurde der Inkubationslösung 50, μl $^{86}\text{Rb}^+$ ($1,5 \times 10^6$ cpm/Fläschchen) für eine Inkubationsperiode von 3-10min zugegeben. In diesem Zeitraum steigt die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme linear an. Stoppen des Aufnahmeporgangs, Aufarbeiten der Proben und Messung des aufgenommenen $^{86}\text{Rb}^+$ wurden durchgeführt wie oben für die Bindungsversuche beschrieben. Zur Bestimmung der unspezifischen ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme wurden die Zellen für 4 Stunden mit 10^{-4}M Strophanthin vorinkubiert und der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx in Gegenwart von 10^{-4}M Strophanthin gemessen. Der extrazellulär gebundene Anteil an $^{86}\text{Rb}^+$ wurde während einer Inkubationsperiode von 10sec gemessen. Die spezifische ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme (98) wurde unter Einbeziehung der extrazellulären K^+ -Konzentration pro mg Protein und Minute berechnet. Die Experimente wurden in der Regel bei 0,75 mM K^+ durchgeführt. Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante (K_M) und der maximalen Transportkapazität (V_{max}) wurde die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen bestimmt. Die Berechnung von K_M und V_{max} erfolgte gemäß der Auftragung nach Lineweaver-Burk.

2.6. Messung des zellulären Kalium-, Natrium- und Proteingehaltes

Nach Spülen der Zellen mit 5 mal je 5ml Ca^{2+} -Sorbit-Lösung und Auflösen in 1,3ml Detergenz wurden zur Bestimmung des K^+ -Gehaltes 2x200, μl Portionen entnommen und mit bidestilliertem Wasser auf 5ml verdünnt. Die Messung der K^+ -Gehalte erfolgte mit Hilfe eines Eppendorf-Flammenfotometers.

Die intrazellulären Gehalte des austauschbaren Na^+ wurden durch Inkubation der Zellen mit $^{22}\text{Na}^+$ für 4 Stunden unter Gleichgewichtsbedingungen

ermittelt. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 4ml Waschtirode in 2,0ml serumfreiem Inkubationsmedium inkubiert, dem 50 μ l $^{22}\text{Na}^+$ zugesetzt war. Stoppen der Reaktion, Auflösen des Zellrasens und Bestimmung des zellgebundenen Natriums erfolgte wie in 2.4. beschrieben. Die zelluläre $^{22}\text{Na}^+$ -Aktivität wurde in Kenntnis der im Inkubationsmedium vorhandenen Na^+ -Konzentration als nmol/mg Protein berechnet und um den Anteil der extrazellulär gebundenen $^{22}\text{Na}^+$ -Radioaktivität korrigiert. Diesen erhält man annähernd durch Messung der zellgebundenen Radioaktivität nach einer Inkubationszeit von 10sec (184).

Die Messung des Proteingehaltes der Zellen wurde nach der Methode von Lowry (115) mit Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt.

2.7. Messung der spezifischen (^3H)(-)CGP 12177-Bindung

Die Bindungsexperimente zur Messung von Zahl und Affinität der Beta-Adrenozeptoren in Hühner-Herzzellen wurden unter Gleichgewichtsbedingungen bei 37°C durchgeführt, wie für die Messung der Herzglykosid-Rezeptoren beschrieben (2.4.). Die Zellen wurden nach zweimaligem Spülen mit 4ml Waschtirode für eine Inkubationszeit von 60min in serumfreiem Versuchsmedium inkubiert (Inkubationsvolumen 4,1ml). Die Beta-Adrenozeptorbindung erfolgte durch Zugabe des radioaktiv markierten, unselektiven Beta-Adrenozeptorenblockers (^3H)(-)CGP 12177 (141,166) zum Inkubationsmedium. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und der maximalen Bindungskapazität wurden die Zellen bei verschiedenen (^3H)(-)CGP 12177-Konzentrationen inkubiert (2×10^{-11} – $6 \times 10^{-9}\text{M}$); alle anderen Bindungsstudien wurden mit $6 \times 10^{-10}\text{M}$ (^3H)(-)CGP 12177 (ca. $1,2 \times 10^5\text{cpm}$) in den Muskelzellkulturen bzw. mit $2 \times 10^{-9}\text{M}$ (^3H)(-)CGP 12177 (ca. $4,8 \times 10^5\text{cpm}$) in den Bindegewebszellkulturen durchgeführt. Zur Berechnung der spezifischen Bindung wurde die unspezifische Bindung subtrahiert, die in Gegenwart von 10^{-5}M (-)Timolol (142) ermittelt wurde. Stoppen des Experiments und Messung der zellgebundenen Radioaktivität erfolgte wie in 2.4. beschrieben. Zur Subklassifizierung der Beta-Adrenozeptoren in Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren wurde die spezifische (^3H)(-)CGP 12177-Bindung durch

verschiedene Konzentrationen selektiver, nicht radioaktiv markierter Beta-Adrenozeptor-Liganden verdrängt. Die Dissoziationskonstanten der verdrängenden Liganden (K_D) können nach Cheng und Prusoff (36) berechnet werden:

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L}{K_L}}$$

IC_{50} entspricht der Konzentration des verdrängenden Liganden, die 50% der (3H)(-)CGP 12177-Bindung verdrängt; L ist die verwendete Konzentration und K_L die Dissoziationskonstante von (3H)(-)CGP 12177.

2.8. Messung der cAMP-Bildung

Die Messung der cAMP-Bildung in intakten Herzmuskelzellen erfolgte in modifizierter Form nach der von Porzig beschriebenen Methode (142). Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Spülen mit 4ml Waschtirode zunächst bei 37°C in 4ml serumfreiem Medium in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers IBMX ($10^{-3}M$) vorinkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Herzzellen für 2min bei 37°C in 4ml eines Versuchsmediums inkubiert, das $10^{-3}M$ IBMX, $10^{-3}M$ Ascorbinsäure als Antioxidans sowie verschiedene Konzentrationen des Beta-Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol ($10^{-9}M$ - $10^{-6}M$) enthielt. Die Inkubation wurde durch zweimaliges Spülen mit 5ml eiskalter Ca^{2+} -Sortit-Lösung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1000 µl eiskalter 5% Trichloressigsäure für 60min aufgelöst (141). 800 µl wurden abpipettiert, mit 2N NaOH (ca. 120 µl) neutralisiert (pH 7) und mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von je 1000 µl gebracht. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte nach der von Salomon (150) beschriebenen chromatographischen Trennmethode über Dowex- und Aluminiumsäulen (Abb.3): Polypropylensäulen (0,7x4cm) werden mit 1000 µl Dowex-Lösung (200-400 mesh, 0,23g/ml) oder 0,6g neutralem Aluminiumoxid gefüllt und vierwöchentlich erneuert. Vor dem Versuch werden die Dowex-Säulen mit 10ml

Säulenchromatographische Trennung zur cAMP - Messung

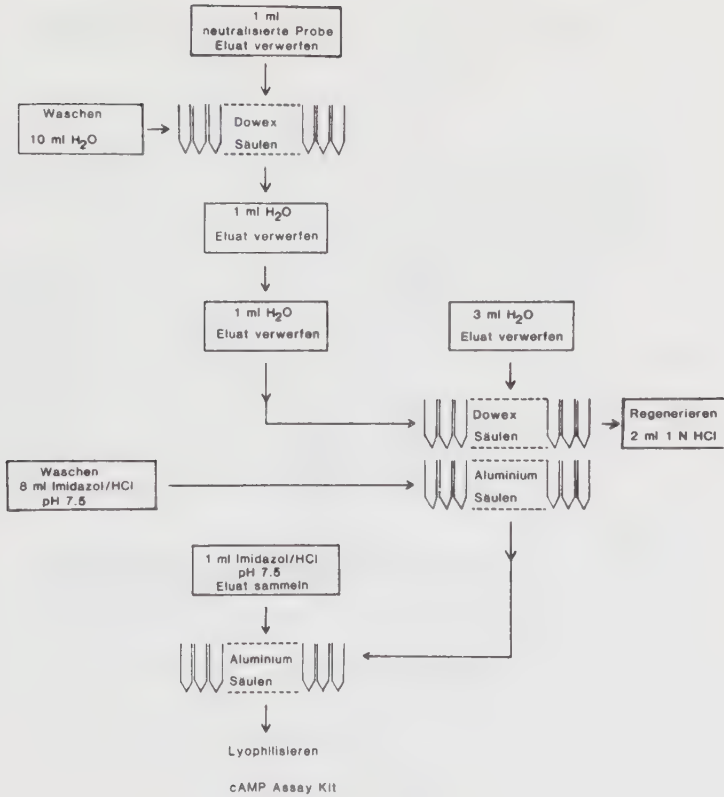


Abb. 3

Säulenchromatographische Trennung zur cAMP-Messung

H₂O, die Aluminium-Säulen mit 8ml 0,1 M Imidazol/HCl pH 7,5 gewaschen. Die neutralisierten Proben (1000/ul) werden in die vorbereiteten Dowex-Säulen pipettiert. Das Eluat und zwei folgende 1ml H₂O-Eluate werden verworfen. Eine anschließende 3ml H₂O-Fraktion wird gesammelt und in die Aluminiumsäulen gegeben. Nach Verwerfen des folgenden Eluates wird 1ml 0,1M Imidazol/HCl pH 7,5 zugegeben und die Fraktion wiederum gesammelt. Die (³H)cAMP-Wiederfindung beträgt 30-40%.

Die gesammelte Fraktion wird lyophilisiert und das Lyophilisat in 150/ul bidestilliertem Wasser aufgelöst. Daraus werden nun 2x50/ul Proben für den anschließenden cAMP-Proteinbindungsassay (Amersham-Buchler, Braunschweig) (172) entnommen. Jede 50/ul Probe wird mit 50/ul (³H)cAMP (0,9pmol, ca. 6×10^3 cpm) und 100/ul cAMP-Bindungsprotein (aus Rinderskelettmuskel) für 120min bei 0°C in Eppendorf-Cups inkubiert. Im Anschluß an die Inkubationsperiode werden der Probe 100/ul Aktivkohleadsorbens zugegeben. Sie wird danach 10sec mit einem Schüttelmixer suspendiert und 2min mit 12.000 U/min zentrifugiert (alle Schritte bei 0°C). 200/ul des Überstandes werden entnommen, und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Fa. Berthold-Frieseke) gemessen.

Gemäß einer cAMP-Eichkurve (0,25-16pmol) läßt sich der cAMP-Gehalt der Proben pro 50/ul berechnen. Entsprechend den Verdünnungsfaktoren und der Wiederfindung aus der Säulenchromatographie wird der cAMP-Gehalt pro Versuchsansatz ermittelt. Durch Subtraktion des zellulären cAMP-Gehaltes in Abwesenheit von Isoproterenol und durch Bezugnahme auf Zellprotein und Inkubationszeit ergibt sich die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung/mg Protein x min.

2.9. Messung der Kontraktilität kultivierter Hühner-Herzmuskelzellen

Mit Hilfe eines elektronisch-optischen Systems (12,81,93,100,181,183,184,191, 194,195, Abb.4a) lassen sich Kontraktionsfrequenz, -amplitude und -geschwindigkeit der Herzmuskelzellen registrieren. Um Kontraktionsmessungen an den Herzmuskelzellen in den für alle anderen Experimente verwendeten 25cm² Plastik-Kulturfläschchen durchführen zu können, wird der Schraubverschluß der

Elektrooptisches System zur Registrierung von Kontraktionen kultivierter Herzmuskelzellen

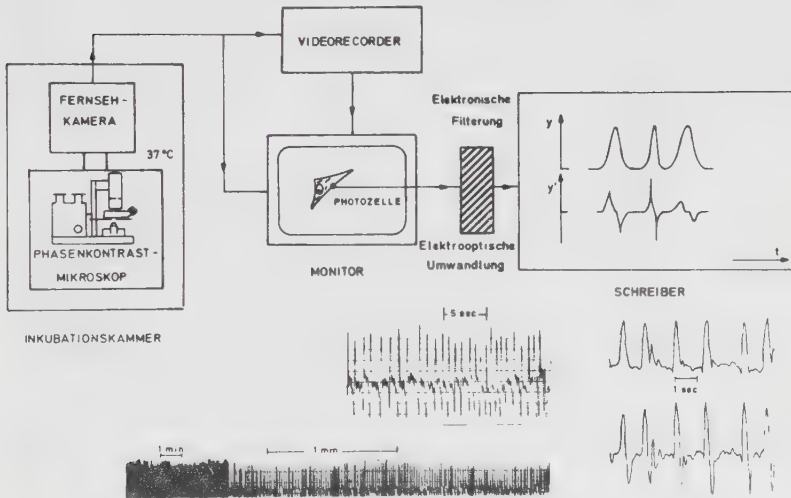


Abb.4a

Schema: Registrierung von Kontraktionsfrequenz, -amplitude und -geschwindigkeit in kultivierten Herzmuskelzellen (siehe 194).

Fläschchen gegen einen Perfusions-Stimulations-Adapter ausgetauscht (Abb.4). Damit ist es möglich, zwei Elektroden am Boden des Kulturfläschchen zur elektrischen Stimulation sowie je eine zu- und abführende Kanüle zur kontinuierlichen Perfusion in das Kulturfläschchen einzubringen. Das so präparierte Kulturfläschchen wird auf den Tisch eines Phasenkontrastmikroskops (Leitz Diavert, 300fache Vergrößerung) gestellt. Die am Adapter angebrachten Stimulationselektroden werden an einen Grass SD Stimulator angeschlossen (100V, Pulsdauer 5msec, Stimulationsfrequenz 60-150/min), und das zu- und abführende Perfusionssystem wird über eine Ismatec-Schlauchpumpe (Perfusionsgeschwindigkeit 3,8ml/min) mit Vorratsgefäßen verbunden, die die Inkubationslösungen für die Kontraktilitätsexperimente enthalten (CMRL-Salzlösung, $[K^+] = 3,5 \text{ mM}$; $[Ca^{2+}] = 0,6-1,2 \text{ mM}$; 37°C).

Das Bild der schlagenden Herzmuskelzellen wird mittels einer auf das Mikroskop aufgesetzten Fernsehkamera (Grundig FA 70B) auf einem Monitor (Grundig BG 23T) sichtbar gemacht. Es kann mit Hilfe eines Videorecorders (Grundig BK 3000 Color) auf einem Videoband gespeichert werden. Das Phasenkontrastmikroskop und die Fernsehkamera sind in einem Gehäuse eingebaut, das die Regelung der Innentemperatur (37°C) durch einen Thermostaten erlaubt. Zur Registrierung der Kontraktionen werden die Änderungen des Hell-Dunkel-Kontrastes der dunklen Zellen auf dem hellen Hintergrund des Bildschirms während des Kontraktionsablaufes durch Photozellen (BPY 61, Fa. Siemens) abgeleitet. Dazu werden die Photozellen so am Monitor befestigt, daß sie am Zellrand zu liegen kommen. Die rhythmischen Bewegungen des Zellrandes führen so zu einer periodischen Zu- und Abnahme der von der Photoelektrode registrierten Lichtintensität. Diese Änderungen der Lichtintensität werden von einem Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt, elektronisch gefiltert und von einem Hellige-Mehrkanalschreiber registriert. Über einen differenzierenden Vorverstärker kann die Pulsationsamplitude nach der Zeit abgeleitet werden.

Zu Beginn einer Kontraktionsmessung wird zunächst das Wachstums- oder Inkubationsmedium in dem zu untersuchenden Zellkulturfläschchen abgesaugt und durch CMRL-Salzlösung in der für die Untersuchung gewünschten Zusammensetzung

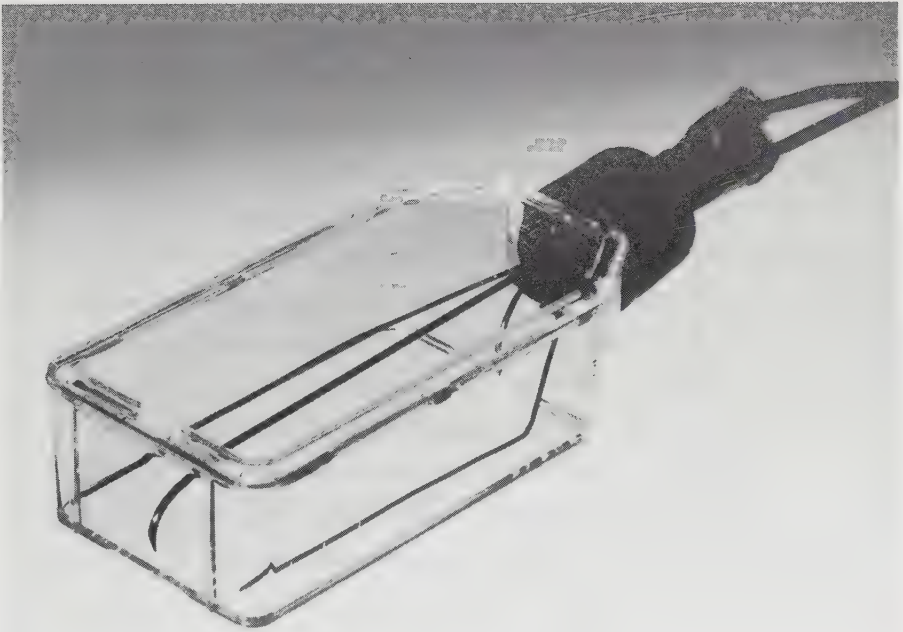


Abb.4b

Kontraktionskammer: 25cm² Plastik-Kulturfläschen mit Perfusions-Stimulations-Adapter.

ersetzt. Danach wird der Perfusions-Stimulations-Adapter eingesetzt und mit der Registrierung begonnen. Wenn sich nach 10-15min ein stabiles Gleichgewicht von Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit eingestellt haben, kann mit dem Experiment begonnen werden: Zur Erstellung einer Strophanthin-Dosis-Wirkungskurve wurden die elektrisch stimulierten Zellen je 7min, für die Ermittlung eines konzentrationsabhängigen Isoproterenol-Effektes je 3min in kumulativer Weise mit jeder Konzentration perfundiert. Am Ende des Experiments erfolgte jeweils eine etwa zehnminütige Auswaschphase, um den Rückgang der Kontraktilitätsparameter auf den Ausgangswert zu kontrollieren. Nur zur Bestimmung von Frequenzeffekten wurden die Zellen nicht stimuliert. Bei den Strophanthin-Experimenten waren die Maximaleffekte jeweils nach spätestens 5min, bei den Isoproterenol-Versuchen nach 1-2min erreicht. Zur Auswertung der Inotropie-Experimente wurden alle 30sec (Isoproterenol) bzw. alle 60sec (Strophanthin) die Kontraktionsgeschwindigkeiten oder die Gesamtpulsationsamplituden von je fünf Kontraktionen in Millimetern ausgemessen und in Prozent gegenüber einem maximalen Effekt aufgetragen, der bei 3.6mM Ca^{2+} erreicht wird (ausführliche Darstellung in 194).

Abb. 5 demonstriert die Bedeutung der Konstanthaltung der Schlagfrequenz bei den Inotropie-Experimenten. Denn bei erhöhter Schlagfrequenz kommt es zu einem ausgeprägten negativen Treppenphänomen: Kontraktionsamplitude, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit sind bei erhöhter Frequenz erniedrigt.

2.10. Messung des zellulären ATP-Gehaltes

Die Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes wurde mit der Luciferase-Methode durchgeführt (8,155). Die Zellen wurden mit 5ml Waschtyrode gespült und anschließend durch Zugabe von 600 μl eiskalter 6% HClO_4 für 60min denaturiert. Für das weitere Vorgehen wurden nun 500 μl aus den Kulturfläschchen abpipettiert und in Eppendorf-Cups gegeben. Abkratzen des Zelldetritus vom Boden des Kulturfläschchens und anschließende Abzentrifugation ergab keine höheren ATP-Gehalte. Nach Neutralisation mit 2N KOH auf pH 7 wurden die Proben 3min bei 80°C erhitzt und 2min bei 12.000 U/min abzentrifugiert

WIRKUNG DER STIMULATIONSFREQENZ AUF DIE KONTRAKTILITÄTS- PARAMETER KULTIVierter HÜHNER - HERZMUSKELZELLEN

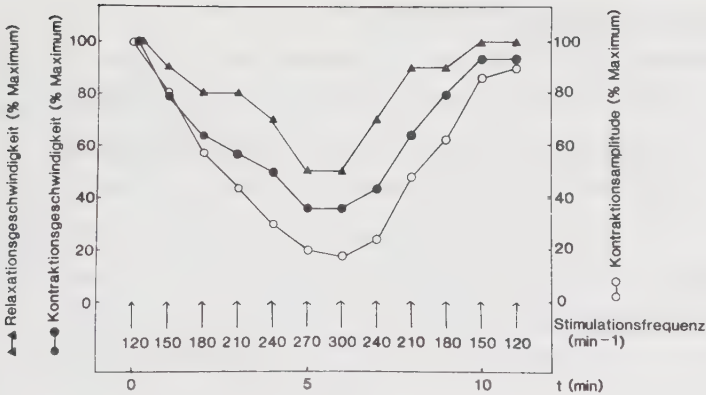


Abb.5

Wirkung der Stimulationsfrequenz auf die Kontraktilitätsparameter kultivierter Hühner-Herzmuskelzellen

Herzmuskelzellen wurden extern mit verschiedenen Stimulationsfrequenzen elektrisch gereizt (100V, 5ms). Kontraktionsamplitude, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit einer repräsentativen Zelle sind aufgetragen. $[K^+] = 3,5mM$; $[Ca^{2+}] = 0,6mM$, Temp. 37°C.

(Eppendorf-Zentrifuge). Aus dem Überstand wurden $2 \times 100 \mu\text{l}$ für die ATP-Messung entnommen. Die ATP-Messung erfolgte mittels der Biolumineszenz-Methode in einem Biolumat LB 9500 (Fa. Berthold, Wildbach) durch Zugabe von Luciferase-Luciferin (1 mg/ml). Die Meßperiode betrug jeweils 10sec. Die spezifische Biolumineszenz wurde aus der Gesamtlumineszenz durch Subtraktion von Luciferaseaktivität in Leerröhrchen und Probeaktivität ohne Luciferasezusatz bestimmt. ATP-Standards enthielten 10^{-3} M – 10^{-7} M ATP in 1 M Imidazol/HCl pH 7,25.

2.11. Messung des Proteingehaltes der Zellen

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Herzzellen wurden die Zellen mittels einer in PBSAG gelösten Trypsin (0,05%)-EDTA (0,02%)-Lösung (15min, 37°C) vom Boden des Kulturfläschchens abgelöst. Durch mehrmaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in PBSAG wurde das Trypsin entfernt. Anschließend wurde die Zellzahl mit einem Hämocytozometer, der Proteingehalt nach Lowry (115) bestimmt. Folgende Werte wurden ermittelt: Hühner-Herzmuskelzellen: $5,5 \times 10^6$ Zellen/mg Protein; Hühner-Herzbindegewebszellen: 4×10^6 Zellen/mg Protein (186,189, 191).

3. ERGEBNISSE

3.1. Toleranzentwicklung bei Herzglykosid-Exposition in Hühner-Herzmuskelzellen

3.1.1. Charakterisierung der Herzglykosid-Rezeptoren

Zur Charakterisierung der Herzglykosid-Rezeptoren kultivierter

Hühner-Herzmuskelzellen wurde die spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung an Hühner-Herzmuskelzellen unter Gleichgewichtsbedingungen bei 37°C gemessen.

Abb.6a zeigt die konzentrationsabhängige, spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung bei einem extrazellulären Kaliumgehalt von 3,5 mM. In Abb.6b sind die Meßdaten gemäß der Auftragung nach Scatchard dargestellt: Der Scatchard Plot ergibt eine Gerade, was eine einheitliche Klasse von Bindungsstellen anzeigt. Aus dem Schnittpunkt der Gerade mit der Ordinate läßt sich die maximale Bindungskapazität errechnen, die Steilheit der Gerade gibt die Dissoziationskonstante (K_D) der Bindung an. Die K_D beträgt $(4,3 \pm 0,2) \times 10^{-7} \text{ M}$, die maximale Bindungskapazität wurde zu $(4,1 \pm 1,1) \text{ pmol/mg Zellprotein}$ berechnet. Dies entspricht einer Zahl von ca. 750.000 Herzglykosid-Rezeptoren pro Zelle ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$).

Die Ergebnisse des in Tabelle 1 gezeigten Experimentes verdeutlichen, daß die spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung tatsächlich eine Bindung an den Herzglykosid-Rezeptor darstellt: Die Bindung von (^3H)Strophanthin wird durch 10^{-6} M nicht radioaktiv markiertes Strophanthin, Digoxin und Digitoxin etwa in gleicher Weise, von dem aufgrund seines gesättigten Lactonrings weniger affinen Dihydrostrophanthin aber nur in deutlich geringerem Maße verdrängt. Andere Steroidmoleküle, z.B. Dexamethason oder aber Beta-Rezeptorenblocker, z.B. (-)Propranolol, haben keinen Einfluß auf die (^3H)Strophanthin-Bindung.

Die Inkubation der Zellen in Strophanthin führt konzentrationsabhängig zur Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes (Abb.7). Der EC_{50} -Wert für die halbmaximale Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+/\text{K}^+$)-Aufnahme beträgt $(4,3 \pm 0,6) \times 10^{-6} \text{ M}$ Strophanthin, der halbmaximale Abfall des Zell- K^+ wird in Gegenwart von $(3,8 \pm 0,6) \times 10^{-6} \text{ M}$ Strophanthin erreicht ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$).

Strophanthin steigert konzentrationsabhängig Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen (Abb.8). Diese Befunde stellen in Herzmuskelzellkulturen Äquivalente einer positiv inotropen Wirkung dar

KONZENTRATIONSABHÄNGIGE (^3H)-STROPHANTHINBINDUNG
IN HÜHNERHERZMUSKEL - ZELLKULTUREN

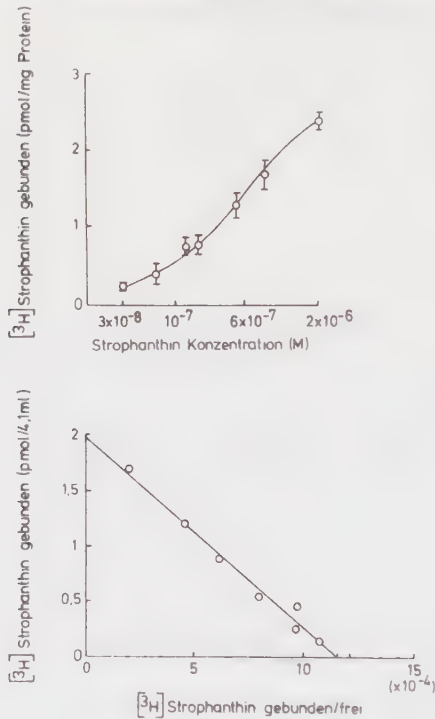


Abb.6

Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen (^3H)Strophanthin-Bindung in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

a) Nach einer Kulturdauer von 2 Tagen wurden Hühner-Herzmuskelzellen in serumhaltigen Inkubationsmedium (2.2.c) mit unterschiedlichen (^3H)Strophanthin-Konzentrationen inkubiert (37°C , $[\text{K}^+] = 3,5\text{mM}$). Im Anschluß daran wurde die spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung gemessen. Die unspezifische (^3H)Strophanthin-Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-4}M Strophanthin (3% der maximal gebundenen Radioaktivität) ermittelt. Zur Berechnung der spezifischen (^3H)Strophanthin-Bindung wurde bei jeder Konzentration die unspezifische Bindung von der Gesamtbinding subtrahiert. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$.

b) Die Meßdaten der Abb.a sind als Scatchard Plot (151) aufgetragen. Die lineare Regression ergibt folgendes Ergebnis: Bindungskapazität (μ) = $2,9\text{pmol/mg Protein}$; Dissoziationskonstante (K_D) = $4,2 \times 10^{-7}\text{M}$; $r = -0,99$.

Tabelle 1:

Spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung an kultivierte Hühner-Herzmuskelzellen.
Einfluß von 10^{-6}M Strophanthin, Digitoxin, Digoxin, Dihydrostrophanthin,
Dexamethason und (-)Propranolol

10^{-6}M	cpm/mg Protein
-	17775 $\pm$ 971
Strophanthin	4167 $\pm$ 284
Digitoxin	2605 $\pm$ 533
Digoxin	3624 $\pm$ 358
Dihydrostrophanthin	15626 $\pm$ 430
Dexamethason	18439 $\pm$ 1371
(-)Propranolol	18382 $\pm$ 113

Die spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung ($4 \times 10^{-8}\text{M}$) wurde während einer zweistündigen Inkubationsperiode in Gegenwart der angegebenen Substanzen gemessen; Temp. 37°C ; $[\text{K}^+] = 0.75\text{mM}$. Die unspezifische (^3H)Strophanthin-Bindung (1006 ± 101 cpm/mg Protein) wurde bei 10^{-4}M Strophanthin ermittelt. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

EINFLUSS VON STROPHANTHIN AUF ($^{86}\text{Rb}^+ \cdot \text{K}^+$)-AUFNAHME UND ZELL- K^+
IN HÜHNERHERZMUSKEL-ZELLKULTUREN

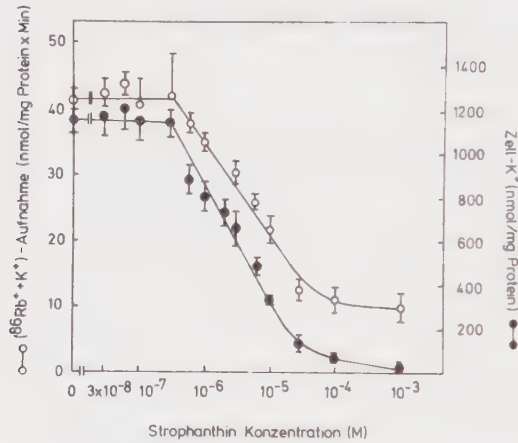


Abb.7

Einfluß von Strophanthin auf ($^{86}\text{Rb}^+ \cdot \text{K}^+$)-Aufnahme und Zell- K^+ in
Hühnerherzmuskel-Zellkulturen

Hühner-Herzmuskelzellen wurden bei 37°C für vier Stunden mit unterschiedlichen Strophanthin-Konzentrationen inkubiert, $[\text{K}^+] = 3,5\text{mM}$. Im Anschluß daran wurden aktiver ($^{86}\text{Rb}^+ \cdot \text{K}^+$)-Influx und Zell-Kalium gemessen. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

EINFLUSS VON g-STROPHANTHIN AUF DIE KONTRAKTIONSGESCHWINDIGKEIT (dy/dt)
KULTIVIERTER HÜHNER-HERZMUSKELZELLEN

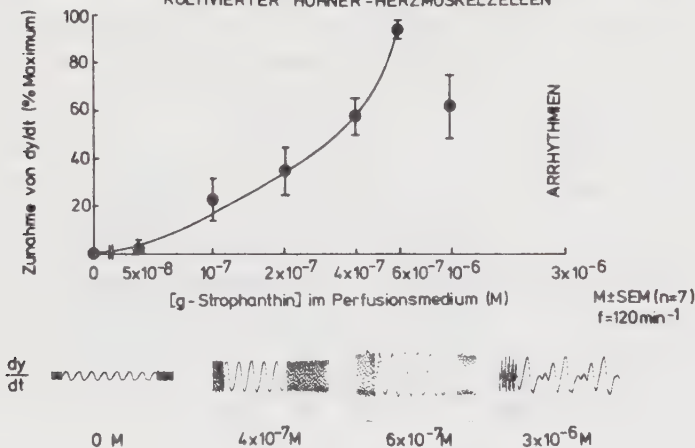


Abb.8

Einfluß von Strophanthin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dy/dt) kultivierter Hühner-Herzmuskelzellen

Der Effekt von Strophanthin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit wurde in kumulativer Weise gemessen, wie in 2.9. beschrieben. Nach einer Kulturdauer von 2 Tagen wurden die Herzmuskelzellen gespült und der Schraubverschluß der Kulturflaschen gegen einen verschraubbaren Perfusions-Stimulations-Adapter ausgetauscht. Die elektrisch stimulierten Zellen (120min⁻¹) wurden je 7min mit verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen inkubiert; $[K^+] = 3,5mM$; $[Ca^{2+}] = 0,6mM$; Temp. 37°C. Die Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit (dy/dt) ist in Prozent des Maximaleffektes aufgetragen. $\bar{X} \pm S.E.M.$, n = 7.

(86,93). Höhere Konzentrationen rufen toxische Effekte (Arrhythmien) hervor (Abb.8). Mit Hilfe des in "Methoden" beschriebenen elektronisch-optischen Systems konnten Kontraktionsfrequenz und -geschwindigkeit elektrisch stimulierter Herzmuskelzellen abgeleitet werden. Das in Abb.8 gezeigte Experiment gibt die Mittelwerte des Strophanthin-Effektes in 7 Zellen einer Kultur an, deren Kontraktionen während des Experiments mit Hilfe eines Videorekorders aufgezeichnet worden sind. Der halbmaximale Anstieg der Kontraktionsgeschwindigkeit wird bei $(4 \pm 1) \times 10^{-7}$ M Strophanthin ($\bar{x} \pm SD$, n=3) erreicht; Arrhythmien treten bei Konzentrationen $\geq 6 \times 10^{-7}$ M auf.

Die Experimente der Abb.6-8 zeigen, daß die spezifische Bindung von Strophanthin in Hühner-Herzmuskelzellen sowohl zur Hemmung des aktiven Kaliumtransportes als auch zur positiv inotropen bzw. toxischen Wirkung führt. Dies klassifiziert die Strophanthin-Bindungsstellen dieser Zellen als Herzglykosid-Rezeptoren (95,186,191-194). Auf den quantitativen Zusammenhang von Rezeptorbesetzung und Hemmung des Kaliumtransportes bzw. positiv inotroper/toxischer Wirkung wird im Folgenden eingegangen werden.

3.1.2. Nachweis der Toleranzentwicklung

Inkubiert man Herzmuskelzellen für 60min mit 3×10^{-6} M Strophanthin, so kommt es regelhaft zum Auftreten von Arrhythmien. Setzt man die Inkubation mit dieser hohen Strophanthin-Konzentration für 3 Tage fort, so sind diese Arrhythmien dagegen nicht mehr nachweisbar (Abb.9). Vergleicht man die positiv inotrope Wirkung von Strophanthin in Kontrollzellen und in Zellen, die für 3 Tage in Gegenwart von 3×10^{-6} M Strophanthin inkubiert worden sind, so zeigt sich, daß in den Strophanthin-exponierten Zellen wesentlich höhere Strophanthin-Konzentrationen nötig sind, um den gleichen positiv inotropen Effekt zu erhalten. Auch die toxischen Effekte (Rhythmusstörungen) werden erst bei höheren Konzentrationen erreicht (Abb.10,11). Werden die Herzmuskelzellen dagegen für 3 Tage in einem Medium gezüchtet, das eine positiv inotrope, aber nicht toxische Strophanthin-Konzentration (3×10^{-7} M) enthält, so ist keine Änderung der Strophanthin-Empfindlichkeit meßbar (Abb.10,11). Diese Experimente belegen

g-Strophanthin Wirkung in Hühner-Herzmuskelzellen

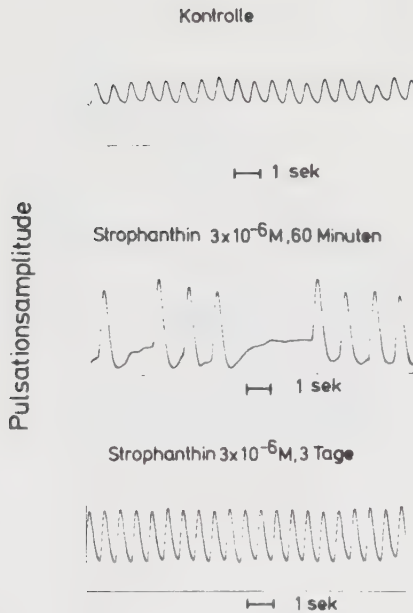


Abb.9

g-Strophanthin-Wirkung in Hühner-Herzmuskelzellen

Die Kontraktionen der Herzmuskelzellen wurden nach einer 60-minütigen ("akuten") bzw. dreitägigen ("chronischen") Exposition der Zellen in $3 \times 10^{-6} \text{M}$ Strophanthin registriert. $[K^+] = 3,5 \text{mM}$; Temp. 37°C .

HERZGLYKOSID - TOLERANZ IN KULTIVIERTEN HÜHNER - HERZMUSKELZELLEN

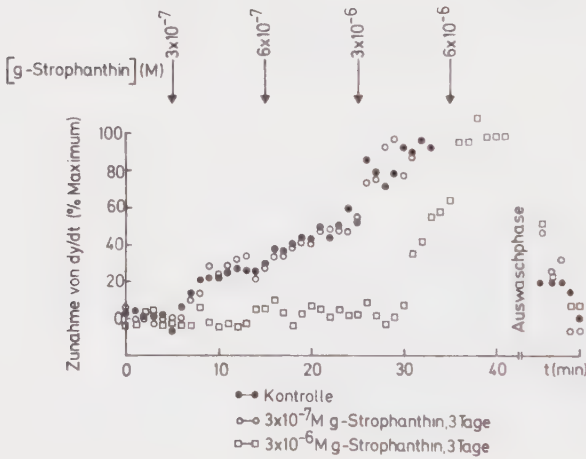


Abb.10

Herzglykosid-Toleranz in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

Der Einfluß steigender Strophanthin-Konzentrationen auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dy/dt) wurde in Kontrollzellen und in Zellen gemessen, die drei Tage in serumfreiem Medium (2.2.d) in Gegenwart von 3×10^{-7} M bzw. 3×10^{-6} M Strophanthin gezüchtet worden waren. Die Kontrollzellen wurden ebenfalls drei Tage in serumfreiem Medium kultiviert und dann für 15min bei 3×10^{-6} M Strophanthin vorinkubiert. Vor der Kontraktionsmessung wurde bei allen Zellen das zellgebundene Strophanthin durch zweistündiges Spülen entfernt. Externe Stimulation der Zellen mit 90 min^{-1} ; $[K^+] = 3,5 \text{ mM}$; $[Ca^{2+}] = 0,9 \text{ mM}$. Die Werte sind in Prozent des Maximaleffektes aufgetragen; $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

HERZGLYKOSID-TOLERANZ IN HÜHNERHERZMUSKEL-ZELLKULTUREN

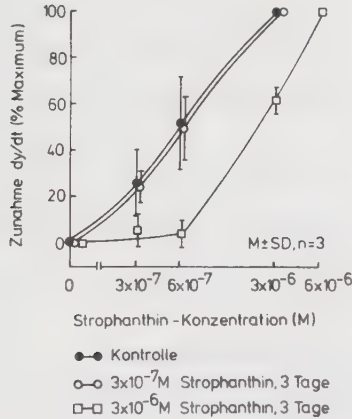


Abb.11

Herzglykosid-Toleranz in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

Die Werte des Experiments aus Abb.10 sind als Dosis-Wirkungskurve aufgetragen. Im selben Experiment wurde nach Entfernen des zellgebundenen Strophanthins (siehe 2.3.) die spezifische (³H)Strophanthin-Bindung (4x10⁻⁷ M) ermittelt; [K⁺] = 0,75mM; [Ca²⁺] = 0,9mM; Temp. 37°C. Kontrolle: 2,3 ± 0,3pmol/mg Protein; 3x10⁻⁷ M Strophanthin: 2,3 ± 0,2pmol/mg Protein; 3x10⁻⁶ M Strophanthin: 4,1 ± 0,4pmol/mg Protein; $\bar{x}$ ± SD, n = 3.

eindeutig das Auftreten einer Toleranzentwicklung der Zellen sowohl bezüglich des positiv inotropen als auch des toxischen Strophanthin-Effektes bei dreitägiger Exposition der Zellen in Gegenwart einer sehr hohen, toxischen Strophanthin-Konzentration.

3.1.3. Mechanismus der Herzglykosidtoleranz

Abb. 12 demonstriert den Zeitverlauf einer dreitägigen Strophanthin ($3 \times 10^{-6} \text{M}$)-Exposition der Herzmuskelzellen. Die strophanthinbedingte Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase führt initial zu einer ca. 50%igen Hemmung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme mit konsekutivem Anstieg des Zell- Na^+ und Abfall des Zell- K^+ . Diese Veränderungen sind jedoch innerhalb von 48 Stunden fast vollständig reversibel: Der aktive Kationentransport steigt wieder an, die Kationengehalte erreichen ihre Ausgangswerte. Parallel dazu kommt es innerhalb von 24-48 Stunden zu einer Zunahme der (^3H)Strophanthin-Bindung der Zellen, die nach Absetzen des Strophanthins innerhalb zweier Tage wieder komplett reversibel ist.

Diese Zunahme der (^3H)Strophanthin-Bindung entspricht einer Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren pro Herzmuskelzelle ohne Änderung der Bindungseigenschaften: Nach dreitägiger Strophanthin-Exposition ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) der Zellen ist die maximale Bindungskapazität B erhöht, während die Dissoziationskonstante K_D der (^3H)Strophanthin-Bindung, die ein Maß für die Affinität der Rezeptoren darstellt, nicht signifikant verändert ist (Abb.13). Da die Zellzahl pro mg Zellprotein in Kontrollzellen ($(5,5 \pm 1,2) \times 10^6$ Zellen/mg Protein) und in Strophanthin-exponierten Zellen ($(5,7 \pm 1,2) \times 10^6$ Zellen/mg Protein, $n=3$) nicht signifikant unterschiedlich ist, beruht dies nicht auf einer Veränderung des Proteingehaltes der Zellen, sondern auf einer Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren pro Zelle.

Der Herzglykosid-Rezeptor ist Bestandteil der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. Daher repräsentiert diese Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren auch eine erhöhte Anzahl an $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase Molekülen, was sich experimentell auch nachweisen läßt: Im Experiment der Abb. 14 wurden wiederum Hühner-

STROPHANTHIN - WIRKUNG IN KULTIVIERTEN HÜHNER - HERZMUSKELZELLEN

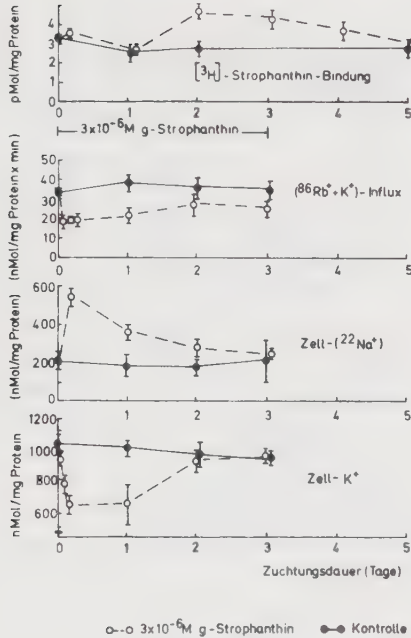


Abb.12

Strophanthin-Wirkung in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

Herzmuskelzellen wurden drei Tage in Gegenwart oder Abwesenheit von $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ Strophanthin gezüchtet, $[\text{K}^+]_3 = 3,5 \text{ mM}$; Temp. 37°C . Zu den angegebenen Zeiten wurden spezifische (^3H) Strophanthin-Bindung, aktiver $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Influx, Zell-Natrium und Zell-Kalium gemessen. Nach drei Tagen wurden die Zellen für weitere zwei Tage in strophanthinfreiem Medium weitergezüchtet und dabei die (^3H) Strophanthin-Bindung gemessen. Zur Messung der (^3H) Strophanthin-Bindung wurde nach Beendigung der Züchtungsphase das zellgebundene Strophanthin durch zweistündiges Spülen der Zellen entfernt und im Anschluß daran die (^3H) Strophanthin-Bindung ($4 \times 10^{-7} \text{ M}$) gemessen; $[\text{K}^+] = 0,75 \text{ mM}$. $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Influx, Zell-Kalium und Zell-Natrium wurden unmittelbar im Anschluß an die Züchtung in strophanthinhaltigem Medium bestimmt. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

Konzentrationsabhängige g-Strophanthinbindung in Hühner-Herzmuskelzellen
Einfluß von g-Strophanthin (3×10^{-6} M, 3 Tage) im Zuchtungsmedium

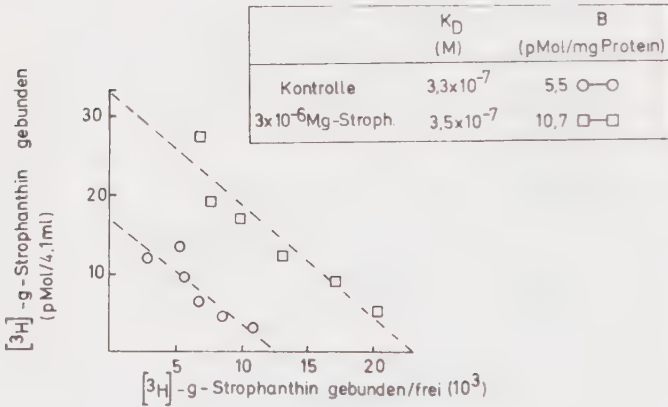


Abb.13

Konzentrationsabhängige g-Strophanthinbindung in Hühner-Herzmuskelzellen.
Einfluß von g-Strophanthin (3×10^{-6} M, 3 Tage) im Zuchtungsmedium

Scatchard-Plot-Analyse der konzentrationsabhängigen, spezifischen (3 H)Strophanthin-Bindung von Kontrollzellen und Zellen, die drei Tage in strophanthinhaltigem Medium (3×10^{-6} M) gezüchtet worden waren. Vor der Messung wurde das zellgebundene Strophanthin durch zweistündiges Spülen der Zellen entfernt; Temp. 37°C ; $[K^+]$ = 3,5mM. Der Proteingehalt der Zellen wird durch die Züchtung in strophanthinhaltigem Medium nicht verändert. $r = -0,9$ in Kontrollzellen und Strophanthin (3×10^{-6} M)-exponierten Zellen; Mittelwerte aus Dreifachmessungen.

AKTIVE ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-AUFNAHME IN HÜHNER-HERZMUSKELZELLEN
EINFLUSS VON STROPHANTHIN ($3 \times 10^{-6}\text{M}$, 3 TAGE) IM ZÜCHTUNGSMEDIUM

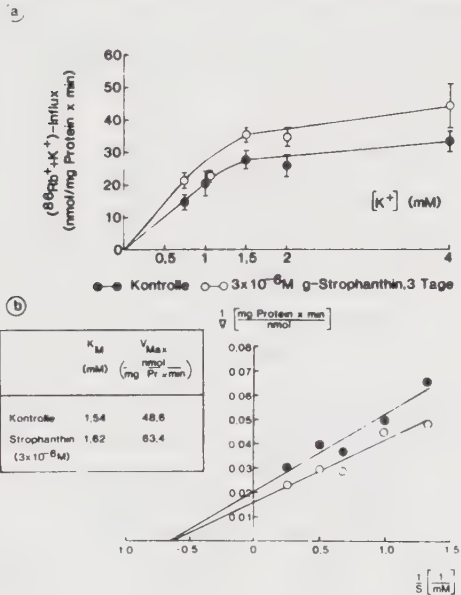


Abb.14

Aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in Hühner-Herzmuskelzellen.
Einfluß von Strophanthin ($3 \times 10^{-6}\text{M}$, 3 Tage) im Züchtungsmedium

a) Die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme wurde in Kontrollzellen und in Zellen, die drei Tage bei $3 \times 10^{-6}\text{M}$ Strophanthin gezüchtet worden waren, bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen im Medium gemessen; Inkubationsperiode 3min; Temp. 37°C . Vor der Messung wurden die Zellen für zwei Stunden in Strophanthin-freiem Medium gespült, um das zellgebundene Strophanthin zu entfernen. Die nicht Strophanthin-hemmbar ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme wurde in Gegenwart von 10^{-4}M Strophanthin gemessen. Der extrazellulär gebundene Anteil an $^{86}\text{Rb}^+$ wurde während einer Inkubationsperiode von 10sec ermittelt. Zur Berechnung der aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme wurde die Strophanthin-insensitive Aufnahme und der 10sec-Wert bei jeder K^+ -Konzentration bestimmt und von der Gesamtaufnahme subtrahiert. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

b) Auftragung der Meßdaten aus Abb. a nach Lineweaver-Burk. Die Berechnung der Michaelis-Konstante K_M und der maximalen Transportkapazität V_{max} erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse. Kontrolle: $r = -0,97$; $3 \times 10^{-6}\text{M}$ Strophanthin: $r = -0,96$. Die zellulären Gehalte an Na^+ bzw. K^+ waren in Kontrollzellen und Strophanthin ($3 \times 10^{-6}\text{M}$)-exponierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Die spezifische (^3H)-Strophanthin-Bindung war in den Strophanthin-behandelten Zellen um 28% gegenüber den Kontrollzellen erhöht.

Herzmuskelzellen für 3 Tage ohne Strophanthin ("Kontrolle") bzw. in Gegenwart von 3×10^{-6} M Strophanthin gezüchtet. Nach Abwaschen des zellgebundenen Strophanthins nimmt in den Strophanthin-behandelten Zellen die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme zu. Dabei handelt es sich um eine Steigerung der maximalen Transportkapazität, wohingegen die Michaelis-Konstante der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme nahezu identisch bleibt (Abb.14). Die zellulären ATP- Gehalte waren in Kontrollzellen (67 ± 2 nmol/mg Protein) und nach dreitägiger Strophanthin (3×10^{-6} M)-Exposition (74 ± 4 nmol/mg Protein) ebenfalls nicht wesentlich unterschiedlich ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$).

Diese Ergebnisse zeigen, daß dreitägige Züchtung der Herzmuskelzellen in einem Inkubationsmedium, das 3×10^{-6} M Strophanthin enthält, zur Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren und damit der Zahl aktiver Na^+/K^+ -Pumpmoleküle führt. Durch die gesteigerte Pumpkapazität gleichen die Zellen die Störung der Na^+/K^+ -Homöostase aus. Dies stellt den Mechanismus der Toleranzentwicklung bei Herzglykosid-Exposition dar.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Zunahme der (^3H)Strophanthin-Bindung/mg Protein während dreitägiger Strophanthin(3×10^{-6} M)-Exposition durch Zugabe des Proteinsynthesehemmers Cycloheximid ($10 \mu\text{g/ml}$) verhindert werden kann.

Kontrolle:	$4,0 \pm 0,2$ pmol/mg Protein
Kontrolle + Cycloheximid:	$3,8 \pm 0,1$ pmol/mg Protein
Strophanthin:	$5,3 \pm 0,1$ pmol/mg Protein
Strophanthin + Cycloheximid:	$4,0 \pm 0,3$ pmol/mg Protein ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$)

Das Experiment zeigt, daß die Strophanthin(3×10^{-6} M)-induzierte Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren durch Cycloheximid verhindert werden kann.

3.1.4. Regulation der Beta-Adrenozeptoren bei der Herzglykosid-Toleranz

Ist die Toleranzentwicklung nach Herzglykosid-Exposition spezifisch für Herzglykoside, oder ist auch die Wirkung anderer positiv inotroper Substanzen abgeschwächt?

In dem Experiment der Abb.15 wurden Herzmuskelzellen für 3 Tage in Gegenwart oder

Isoproterenol-Wirkung nach chronischer Strophanthin-Exposition in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

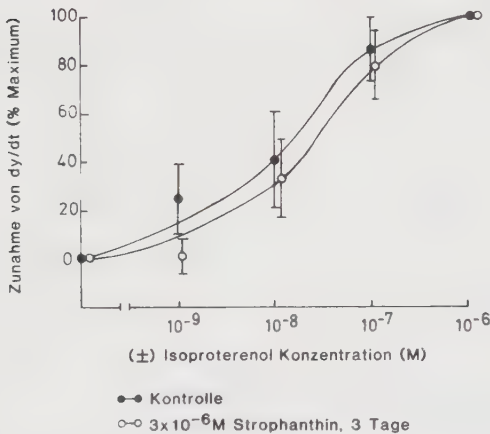


Abb.15

Isoproterenol-Wirkung nach chronischer Strophanthin-Exposition in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

Der Effekt steigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dy/dt) wurde in Kontrollzellen und in Zellen gemessen, die drei Tage in Gegenwart von 3×10^{-6} M Strophanthin gezüchtet worden waren. Vor der Messung wurde das zellgebundene Strophanthin durch zweistündiges Spülen der Zellen entfernt. Externe Stimulation der Zellen mit 120 min^{-1} ; $[K^+] = 3,5 \text{ mM}$; $[Ca^{2+}] = 0,9 \text{ mM}$. Die Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit ist in Prozent des Maximalwertes aufgetragen; $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$. Im selben Experiment wurde auch die spezifische (3H)Strophanthin-Bindung (4×10^{-7} M) bestimmt; $[K^+] = 0,75 \text{ mM}$; Kontrolle: $6,1 \pm 0,6 \text{ pmol/mg Protein}$; 3×10^{-6} M Strophanthin: $8,0 \pm 0,2 \text{ pmol/mg Protein}$; $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

Abwesenheit von $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ Strophanthin gezüchtet. Anschließend wurde die Wirkung von Strophanthin und des Beta-Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol auf die Kontraktionsgeschwindigkeit gemessen. Während in den Strophanthin-exponierten Zellen die Digitalisempfindlichkeit deutlich vermindert ist, bleibt die Ansprechbarkeit auf Isoproterenol unverändert. Es kommt zu keiner "Kreuztoleranz" gegenüber Isoproterenol.

Die Regulation von Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren bei chronischer Strophanthin-Exposition ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$, 3 Tage) verdeutlicht Tab.2: Die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren nimmt um ca. 100% zu, die Bindungsaffinität bleibt unverändert. Zahl und Affinität der Beta-Adrenozeptoren, gemessen mit (^3H)CGP 12177, ändern sich jedoch nicht. Die Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren bei chronischer Digitalisgabe hat somit keinen Einfluß auf die Zahl der Beta-Adrenozeptoren.

3.1.5. Quantitative Aspekte der Herzglykosid-Toleranz

In den bisher gezeigten Experimenten wurde die Züchtung stets in Gegenwart von $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ Strophanthin vorgenommen, einer Konzentration, die reproduzierbar nach wenigen Minuten zu Arrhythmien führt (Abb.9).

Ist auch im Bereich "therapeutisch wirksamer", nicht toxischer Strophanthin-Konzentrationen mit einer Toleranzentwicklung zu rechnen?

Abb.16 demonstriert den Zusammenhang zwischen der Hemmung des aktiven Kaliumtransportes bei "akuter" Strophanthin-Gabe und der kompensatorischen Zunahme der Zahl aktiver ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Moleküle bei "chronischer" Strophanthin-Exposition. In Abb.16a ist die Hemmung des aktiven Kaliumtransportes ($\downarrow$) und der Abfall des Zell-Kaliums ($\downarrow$) bei vierstündiger Strophanthin-Exposition dargestellt. Abb.16b zeigt den Einfluß einer dreitägigen Strophanthin-Exposition der Zellen auf die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren ($\uparrow$) und den aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx ($\uparrow$) der Zellen.

Bis zu einer Rezeptorbesetzung von maximal 40% kommt es noch zu keiner Hemmung des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx und zu keiner höhergradigen Verminderung des zellulären Kaliumgehaltes (Abb.16a). Züchtet man die Herzmuskelzellen für 3 Tage

Tabelle 2:

Effekt von Strophanthin ($3 \times 10^{-6} \text{M}$, 3 Tage) auf Zahl und Eigenschaften von Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren in Hühner-Herzmuskelzellen

Rezeptor	Kontrolle	$3 \times 10^{-6} \text{M}$ Strophanthin
<u>Herzglykosid-Rezeptor</u>		
Rezeptoren/Zelle	$7,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$
K_D (g-Strophanthin)	$3,3 \times 10^{-7} \text{M}$	$3,5 \times 10^{-7} \text{M}$
<u>Beta-Adrenozeptor</u>		
Rezeptoren/Zelle	$3,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
K_D (CGP 12177)	$3,6 \times 10^{-10} \text{M}$	$3,0 \times 10^{-10} \text{M}$

Herzmuskelzellen wurden für 3 Tage in Gegenwart oder Abwesenheit von $3 \times 10^{-6} \text{M}$ Strophanthin gezüchtet. Nach einer zweistündigen Waschperiode wurden Zahl und Affinität von Herzglykosidrezeptoren und Beta-Adrenozeptoren mittels spezifischer (^3H)Strophanthin- bzw. (^3H)CGP 12177-Bindung bestimmt (siehe Abb.4,14).

HERZGLYKOSID-TOLERANZ IN HÜHNERHERZMUSKEL - ZELLKULTUREN

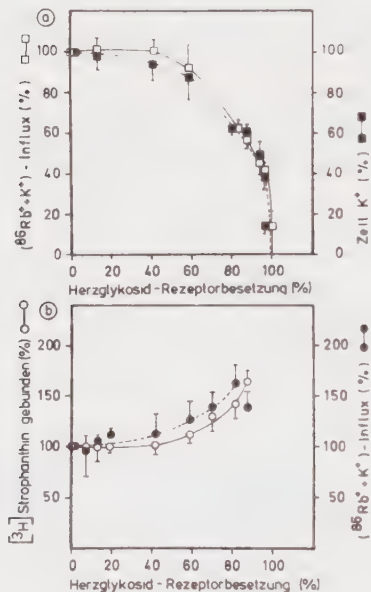


Abb.16

Herzglykosid-Toleranz in Hühnerherzmuskel-Zellkulturen

a) Akute Wirkung: Die Herzmuskelzellen wurden bei verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen inkubiert, wie in Abb.7 beschrieben. In Anschluß daran wurde die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und der Zell-Kaliumgehalt in Gegenwart von Strophanthin bestimmt; $[\text{K}^+] = 3,5\text{mM}$; Temp. 37°C . Der Strophanthin-insensitive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx und der nicht Strophanthin-verdrängbare ($^{191}\text{K}^+$)-Gehalt wurde jeweils in Gegenwart von 10^{-6}M Strophanthin ermittelt; $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$. Im selben Experiment wurde die konzentrationsabhängige, spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung ermittelt, wie in Abb.6 beschrieben. Aus der Dissoziationskonstante der Bindung ($K_D = 4,3 \times 10^{-7}\text{M}$) wurde nach dem Massenwirkungsgesetz für jede Strophanthin-Konzentration die Rezeptorbesetzung berechnet.

b) Chronische Wirkung: Die Herzmuskelzellen wurden für 3 Tage in Gegenwart verschiedener Strophanthin-Konzentrationen gezüchtet, $[\text{K}^+] = 3,5\text{mM}$; Temp. 37°C . Nach zweistündigem Spülen der Zellen wurde die spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung ($4 \times 10^{-7}\text{M}$) und der aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx bestimmt; $[\text{K}^+] = 0,75\text{mM}$; Temp. 37°C . Die spezifische (^3H)Strophanthin-Bindung wurde bei 10^{-6}M Strophanthin, die nicht Strophanthin-hemmbar ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme wurde bei 10^{-3}M Strophanthin ermittelt. Die Rezeptorbesetzung während der dreitägigen Strophanthin-Exposition wurde für jede Konzentration berechnet. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

bei verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen und entfernt danach durch Auswaschen das zellgebundene Strophanthin, so zeigt sich, daß bis zu einer Rezeptorbesetzung von 40% auch kein Anstieg der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren und der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten gefunden wird (Abb.16b). Erst wenn mehr als 60% der Rezeptoren durch Strophanthin besetzt sind, wird akut der Na^+/K^+ -Transport höhergradig gehemmt (Abb.16a) und chronisch eine Zunahme der Zahl der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Moleküle gemessen (Abb.16b). Diese "Schwellendosis" von $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ Strophanthin, entspricht auch der Konzentration, ab der regelmäßig das Auftreten von Arrhythmien in spontan schlagenden Herzmuskelzellen nachgewiesen werden kann (siehe 3.1.).

Die Herzmuskelzelle ist also in der Lage, den Ausfall von bis zu 50% der Pumpmoleküle zu kompensieren, ohne daß eine höhergradige Hemmung des Na^+/K^+ -Transportes und damit eine Zunahme der Rezeptorzahl auftritt. Erst bei toxischen Strophanthin-Konzentrationen, die zu einer höhergradigen Pumphemmung führen, kommt es zur Toleranzentwicklung. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten der Abb.10,11 überein: Nur bei Züchtung der Zellen in Gegenwart einer toxischen Strophanthin-Konzentration ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$) kommt es zu einer Abschwächung des Strophanthin-Effektes, während eine positiv inotrop wirksame Konzentration ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$), die nicht zu Arrhythmien führt, auch keine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve hervorruft.

3.2. Betablocker-Absetzphänomen in Hühner-Herzzellen

3.2.1. Charakterisierung der Beta-Adrenozeptoren

Die Beta-Adrenozeptoren kultivierter Herzzellen von Hühnerembryonen wurden durch Verwendung des Beta-Adrenozeptorenblockers (^3H)(-)CGP 12177 (nicht selektiv, ISA) charakterisiert. Die getrennte Kultivierung von Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen erlaubt die Untersuchung von Beta-Adrenozeptoren zweier verschiedener Zellarten desselben Organs. Die konzentrationsabhängige Bindung von (^3H)(-)CGP 12177 an Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen von Hühnerembryonen ist in Abb.17 dargestellt. Die unspezifische (^3H)(-)CGP 12177-Bindung wurde in beiden Zellarten in Gegenwart von 10^{-5}M (-)Timolol ermittelt. Aus der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard wird deutlich, daß in beiden Zellarten eine einheitliche Klasse von Beta-Adrenozeptoren vorhanden ist. Die Dissoziationskonstanten der (^3H)(-)CGP 12177-Bindung in Herzmuskelzellen ($K_D=5,8 \times 10^{-10}\text{M}$) und Herzbindegewebszellen ($K_D=7,4 \times 10^{-10}\text{M}$) sind ähnlich; die maximale Bindungskapazität beträgt 44 fmol/ mg Protein entsprechend ca. 5000 Beta-Adrenozeptoren pro Zelle in Herzmuskelzellen bzw. 20 fmol/mg Protein entsprechend ca. 3000 Beta-Adrenozeptoren pro Zelle in Herzbindegewebszellen. Die Stereospezifität der Beta-Adrenozeptor-Bindung läßt sich durch die Verdrängung von (^3H)(-)CGP 12177 durch die (-) und (+) Enantiomeren des Beta-Adrenozeptorenblockers Propranolol demonstrieren (Tab.3). Aus diesen Verdrängungsexperimenten können nach Cheng und Prusoff (36; siehe 2.7.) die Dissoziationskonstanten nicht-radioaktiv markierter Liganden berechnet werden. (-)Propranolol verdrängt (^3H)(-)CGP 12177 sowohl in den Muskel- als auch in den Bindegewebszellen in ca. 100-fach niedrigeren Konzentrationen aus der Rezeptorbindung als (+)Propranolol. Diese Stereospezifität beta-adrenerger Liganden stellt eine typische Eigenschaft der Bindung von spezifischen Agonisten und Antagonisten am Beta-Adrenozeptor dar.

Durch die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten des Beta₁-Adrenozeptor-Agonisten (-)Noradrenalin sowie des Beta₂-Adrenozeptor Antagonisten ICI 118551 in Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen lassen sich die Ergebnisse anderer Autoren (32,108) bestätigen, wonach Herzmuskelzellen Beta₁-Adrenozeptoren besitzen,

KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER (³H)(-)CGP 12177 BINDUNG IN KULTIVIERTEN HERZZELLEN

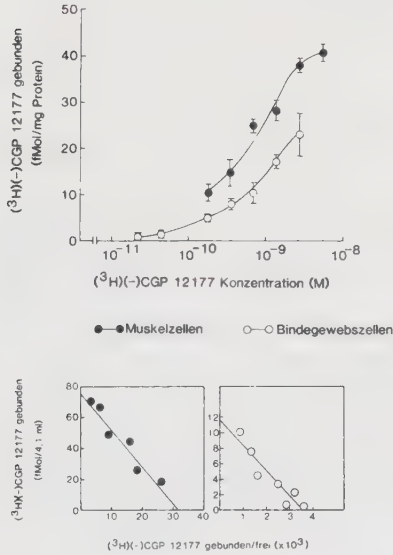


Abb.17

Konzentrationsabhängigkeit der (³H)(-)CGP 12177 Bindung in kultivierten Herzzellen

Abb. (oben): Die konzentrationsabhängige, spezifische (³H)(-)CGP 12177 Bindung wurde in Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen gemessen; serumfreies Medium; Temp. 37°C. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10⁻⁵ M (-)Timolol bei jeder (³H)(-)CGP 12177 Konzentration ermittelt und von der Gesamtbindung subtrahiert. Der Gehalt an Zellprotein betrug in Muskelzellen 1,7mg/Fläschchen, in Bindegewebszellen 0,5mg/Fläschchen. $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

Abb. (unten): Die Scatchard Plot-Analyse der Bindungsdaten ergab folgende Ergebnisse: Muskelzellen: Bindungskapazität (B) = 44fMol/mg Protein; Dissoziationskonstante (K_D) = 5,6x10⁻¹⁰ M, r = -0,97.

Bindegewebszellen: B = 24fMol/mg Protein; K_D = 6,8x10⁻¹⁰ M; r = -0,93.

Tabelle 3:

Dissoziationskonstanten (K_D) von Beta-Adrenozeptor-Agonisten und
-Antagonisten in Hühner-Herzzellen

Beta-adrenerger Ligand

K_D (M) ($\bar{x} \pm SD$)

	Muskelzellen	n	Bindegewebszellen	n
(3H)(-)CGP 12177	$5,8(\pm 2,8) \times 10^{-10}$	5	$7,4(\pm 3,3) \times 10^{-10}$	3
(-)Propranolol	$9,6(\pm 1,6) \times 10^{-10}$	3	$5,9(\pm 3,4) \times 10^{-10}$	3
(+)Propranolol	$1,4(\pm 0,4) \times 10^{-7}$	3	$3,3(\pm 3,1) \times 10^{-7}$	3
(-)Timolol	$2,6(\pm 2,1) \times 10^{-9}$	3	$2,0(\pm 1,6) \times 10^{-9}$	3
(-)Pindolol	$3,8(\pm 1,6) \times 10^{-9}$	3	$8,5(\pm 4,1) \times 10^{-9}$	4
($\pm$)Isoproterenol	$9,1(\pm 4,0) \times 10^{-8}$	3	$5,9(\pm 4,1) \times 10^{-7}$	3
(-)Noradrenalin*	$2,2(\pm 1,4) \times 10^{-6}$	3	$1,5(\pm 0,2) \times 10^{-5}$	3
($\pm$)ICI 118551	$9,5 \times 10^{-8}$	1	$1,0 \times 10^{-9}$	1

Die K_D -Werte der (3H)(-)CGP 12177-Bindung in Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen wurden durch Scatchard-Plot Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung ermittelt, wie in Abb.14 beschrieben. Die Dissoziationskonstanten der nicht markierten Liganden wurden aus Verdrängungsexperimenten der (3H)(-)CGP 12177-Bindung nach Cheng und Prusoff (36) (siehe 2.7.) berechnet. Die (3H)(-)CGP 12177-Konzentrationen waren 6×10^{-10} M (Muskelzellen) bzw. 2×10^{-9} M (Bindegewebszellen). Die Verdrängung der (3H)(-)CGP 12177-Bindung wurde jeweils bei 6 Konzentrationen durchgeführt;
 $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0,01$, K_D -Werte in Muskel- und Bindegewebszellen sind signifikant unterschiedlich (Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

während die Beta-Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen vom Beta_2 -Subtyp sind: Die Dissoziationskonstante von (-)Noradrenalin ist in Muskelzellen um den Faktor 5 niedriger als in Bindegewebszellen, wohingegen ICI 118551 in Bindegewebszellen bereits in 100fach niedrigeren Konzentrationen die Hälfte der Rezeptoren absättigt als in Herzmuskelzellen. Die Bindungsaffinitäten nicht-selektiver Betablocker und des nicht-selektiven Agonisten Isoproterenol unterscheiden sich in beiden Zellarten nicht signifikant.

Der nicht-selektive Beta-Adrenozeptor-Agonist Isoproterenol steigert die cAMP-Bildung in kultivierten Hühnerherzmuskelzellen: Die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung/mg Protein $\times$ min wurde nach 15-minütiger Vorinkubation mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX (10^{-3}M) während einer zweiminütigen Inkubationsperiode gemessen, in der die cAMP-Bildung linear ansteigt. Die halbmaximale Isoproterenol-Konzentration beträgt $3 \times 10^{-8}\text{M}$ (Abb.18).

Die cAMP-Bildung in Hühner-Herzmuskelzellen wird auch durch andere Substanzen gesteigert, die nicht über den Beta-Adrenozeptor, sondern über andere Rezeptoren der Adenylatzyklase ihre Wirkung entfalten. Der Maximaleffekt der Histamin-stimulierten cAMP-Bildung/mg Protein $\times$ min ($\text{EC}_{50}=3 \times 10^{-6}\text{M}$), gemessen während einer ebenfalls dreiminütigen Inkubationsperiode, beträgt aber nur ca. 20% des Maximaleffektes durch Isoproterenol (Experimente nicht gezeigt). Die Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit der Hühner-Herzmuskelzellen durch Isoproterenol kann durch Perfusion der elektrisch stimulierten Myozyten mit verschiedenen Isoproterenol-Konzentrationen mit Hilfe der elektronisch-optischen Registrierung (2.9.) gemessen werden ($\text{EC}_{50}=2 \times 10^{-8}\text{M}$) (Abb.19). Ein positiv chronotroper Effekt wird im Bereich positiv inotrop wirksamer Isoproterenol-Konzentrationen während je dreiminütiger Inkubationszeiten nicht beobachtet (Abb.19).

3.2.2. Regulation der Beta-Adrenozeptoren durch (-)Noradrenalin

Dem Zellkulturmodell kultivierter Herzmuskelzellen in einem serumfreien Züchtungsmedium fehlt eine entscheidende Komponente, nämlich das Vorhandensein

EINFLUSS VON ISOPROTERENOL AUF DIE cAMP-BILDUNG IN HERZMUSKELZELLEN

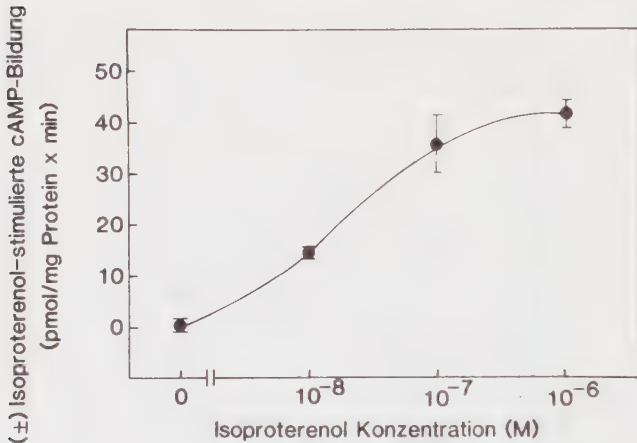


Abb.18

Einfluß von Isoproterenol auf die cAMP-Bildung in Herzmuskelzellen

Die konzentrationsabhängige Wirkung von Isoproterenol auf die cAMP-Bildung/mg Protein x min wurde in Hühner-Herzmuskelzellen bestimmt (siehe 2.8). Nach Vorinkubation der Zellen in serumfreiem Medium mit 10^{-7} M IBMX für 15min wurden die Herzmuskelzellen für eine Inkubationszeit von je 2min mit verschiedenen Isoproterenol-Konzentrationen inkubiert. Die basale cAMP-Bildung in Abwesenheit von Isoproterenol ($19,9 \pm 0,7$ pmol/mg Protein) wurde subtrahiert.

$\bar{x} \pm$ S.E.M., n = 4.

EINFLUSS VON ISOPROTERENOL AUF SCHLAGFREQUENZ UND KONTRAKTIONSGESCHWINDIGKEIT KULTIVierter HERZMUSKELZELLEN

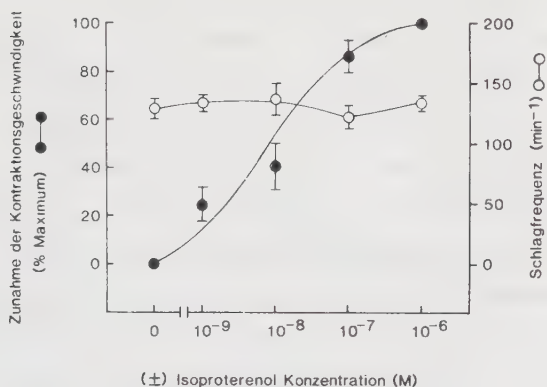


Abb.19

Einfluß von Isoproterenol auf Schlagfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit kultivierter Herzmuskelzellen

Der Effekt steigender Isoproterenol-Konzentrationen auf Schlagfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit von Hühner-Herzmuskelzellen wurde gemessen. Die Zellen wurden in CMRL-Salzlösung (2.2.e) je 3 min bei jeder Isoproterenol-Konzentration perfundiert; $[K^+] = 3,5\text{mM}$; $[Ca^{2+}] = 0,9\text{mM}$. Die chronotrope Wirkung wurde an spontan schlagenden Herzmuskelzellen untersucht; $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

Zur Ermittlung der Isoproterenol-stimulierten Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit wurden die Zellen elektrisch stimuliert (120min^{-1} , 100V , 5ms). Die positiv inotrope Wirkung ist in Prozent des Maximalwertes aufgetragen; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$, $n = 5$.

endogener Katecholamine, die unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu einer partiellen Stimulation des Adenylatzyklase-Systems und zu einer teilweisen Verminderung der Zahl der Beta-Adrenozeptoren führen. Um dieser in vivo-Situation möglichst nahe zu kommen, wird deshalb dem serumfreien Kulturmedium (-)Noradrenalin zugesetzt:

Bestimmt man nach dreitägiger Züchtung von Hühner-Herzmuskelzellen in Gegenwart verschiedener Noradrenalin-Konzentrationen, bei täglichem Mediumwechsel, die (^3H)(-)CGP 12177-Bindung, als Maß der Beta $_1$ -Adrenozeptordichte, so zeigt sich, daß es bereits bei (-)Noradrenalin-Konzentrationen (10^{-9}M - 10^{-8}), die den Bereich von Plasma-Noradrenalin-Konzentrationen des Menschen widerspiegeln, zu einer Abnahme der (^3H)(-)CGP 12177-Bindung um 20-50% kommt (Abb.20). Bei Züchtung in Gegenwart von 10^{-6}M (-)Noradrenalin kommt es sogar zu einer Abnahme der Bindung bis auf 30% des Ausgangswertes. Von verschiedenen Autoren ist an Hühner-Herzmuskelzellen gezeigt worden, daß es sich bei der Katecholamin-induzierten Rezeptor-Down-Regulation um eine Abnahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren ohne Änderung der Bindungseigenschaften handelt (18,118,121). Abb.21 demonstriert den Zeitverlauf der Down-Regulation der Beta $_1$ -Adrenozeptoren durch (-)Noradrenalin in Herzmuskelzellen: Zugabe von 10^{-8}M (-)Noradrenalin führt bereits nach spätestens 1 Stunde zu einer Abnahme der (^3H)(-)CGP 12177-Bindung. Diese Rezeptorabnahme ist nach 4 Stunden praktisch abgeschlossen und bleibt in Gegenwart einer gleichbleibenden (-)Noradrenalin-Konzentration bis zu 96 Stunden konstant. Setzt man dem Züchtungsmedium nach 24 Stunden aber zusätzlich den Beta-Rezeptorenblocker (-)Pindolol, $3 \times 10^{-8}\text{M}$, zu, so ist die Rezeptor-Down-Regulation innerhalb von 24 Stunden fast vollständig reversibel (Abb.21).

Diese Rezeptor-Down-Regulation geht mit einem abgeschwächten Isoproterenol-Effekt einher (Abb.22): Nach Züchtung der Herzmuskelzellen in Gegenwart von 10^{-6}M (-)Noradrenalin ist die cAMP-Bildung im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Noradrenalin bei gleicher Isoproterenol-Konzentration deutlich abgeschwächt. Durch Zugabe verschiedener (-)Noradrenalin-Konzentrationen zum Züchtungsmedium lassen sich somit Zustände verminderter Beta-Adrenozeptordichte und

DOWN-REGULATION DER BETA-ADRENOZEPTOREN DURCH NORADRENALIN IN HERZMUSKELZELLEN

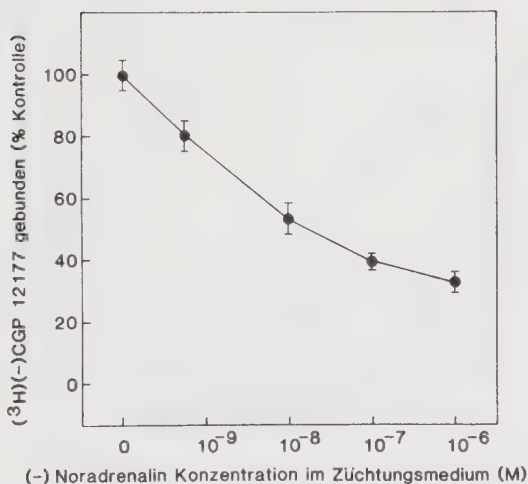


Abb.20

Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren durch Noradrenalin in Herzmuskelzellen

Herzmuskelzellen wurden für 3 Tage in serumfreiem Medium in Gegenwart verschiedener (-)Noradrenalin-Konzentrationen gezüchtet. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden gespült, um das zellgebundene (-)Noradrenalin zu entfernen. Im Anschluß daran wurde die spezifische (³H)(-)CGP 12177 Bindung (6×10^{-10} M) gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-5} M (-)Timolol ermittelt. Der Proteingehalt pro Fläschchen wurde durch (-)Noradrenalin nicht verändert. $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

ZEITVERLAUF DER BETA-ADRENOZEPTOR-
DOWN-REGULATION DURCH NORADRENALIN (10^{-8} M)

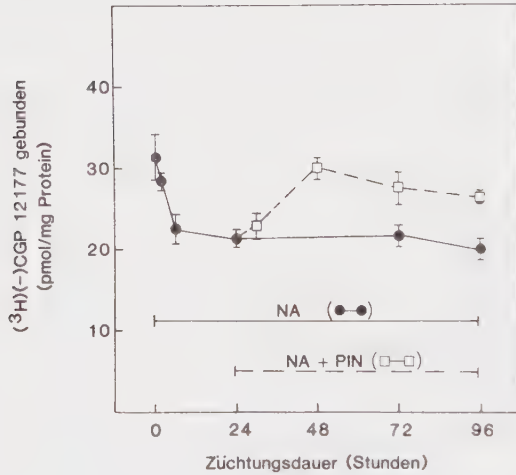


Abb. 21

Zeitverlauf der Beta-Adrenozeptor-Down-Regulation durch (-)Noradrenalin (10^{-8} M)

Herzmuskelzellen wurden für vier Tage in einem serumfreien Medium gezüchtet, das 10^{-8} M (-)Noradrenalin enthielt. Nach 24 Stunden wurde zusätzlich 3×10^{-8} M (-)pindolol zugegeben (□-□). Dem KulturmEDIUM der Kontrollzellen war nur 10^{-8} M (-)Noradrenalin zugesetzt worden (●-●). Zu den angegebenen Zeiten wurde nach zweistündigem Spülen der Zellen die spezifische (3 H)(-)CGP 12177 Bindung (6×10^{-10} M) gemessen. $\bar{x} \pm$ SD, n = 3.

DESENSIBILISIERUNG DER BETA-ADRENOZEPTOREN
DURCH NORADRENALIN (10^{-6} M) IN HERZMUSKELZELLEN

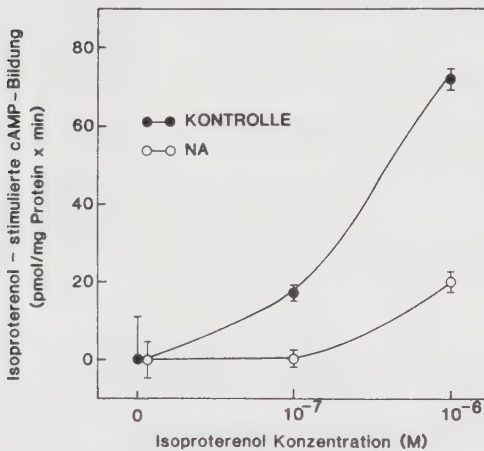


Abb.22:

Desensibilisierung der Beta-Adrenozeptoren durch Noradrenalin (10^{-6} M) in Herzmuskelzellen

Die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung/mg Protein x min wurde in Kontrollzellen und in Zellen gemessen, die für drei Tage in serumfreiem Medium bei 10^{-6} M (-)Noradrenalin gezüchtet worden waren. Nach der Züchtung wurden die Zellen für zwei Stunden gespült, um das zellgebundene (-)Noradrenalin zu entfernen. Die Herzmuskelzellen wurden für 15min in Gegenwart von 10^{-3} M IBMX und anschließend für 3min bei verschiedenen Isoproterenol-Konzentrationen inkubiert. Die basale cAMP-Bildung in Abwesenheit von Isoproterenol wurde subtrahiert. $\bar{x} \pm$ SD, n = 3.

abgeschwächter Katecholaminempfindlichkeit unterschiedlichen Grades simulieren. Noradrenalin-Züchtung der Zellen beeinflusst die Beta_1 -Adrenozeptoren der Herzmuskelzellen und die Beta_2 -Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen in quantitativ unterschiedlicher Weise: In den Experimenten, die in Abb.23 zusammengefaßt sind, wird deutlich, daß die Zahl der Beta_2 -Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen nach dreitägiger (-)Noradrenalin-Exposition in wesentlich geringerem Maße vermindert vorliegt als die Zahl der Beta_1 -Adrenozeptoren der Herzmuskelzellen. Bei (-)Noradrenalin-Konzentrationen, die im Bereich menschlicher Plasma-Konzentrationen (10^{-9}M - 10^{-8}M) liegen, ist die (^3H)(-)OGP 12177- Bindung in Bindegewebszellen gegenüber Kontrollzellen nicht verändert, während die Beta_1 -Adrenozeptoren der Herzmuskelzellen um 20-50% down-reguliert vorliegen. Diese Tatsache läßt sich sehr gut mit der relativen Beta_1 -Selektivität des Noradrenalins in Einklang bringen.

3.2.3. Betablocker-Absetzphänomen im Noradrenalin-freien Zellkultursystem

Die kardialen Auswirkungen des Betablocker-Absetzphänomens werden erklärt durch eine Überempfindlichkeit des Herzens gegenüber endogenen Katecholaminen nach plötzlichem Absetzen einer Betablockade (120,130,143). Läßt sich ein Absetzphänomen im Zellkulturmodell nachahmen?

Zur Etablierung eines zellulären Modells des Betablocker-Absetzphänomens wurden Herzmuskelzellen für drei Tage in serumfreiem Kulturmedium ohne Zusatz von Katecholaminen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen dreier verschiedener Beta-Rezeptorenblocker gezüchtet. Nach Auswaschen der zell-gebundenen Betablocker wurden die Rezeptorenzahl und die Ansprechbarkeit der Zellen in Hinblick auf die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung und die Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit gemessen. Um die Bedeutung der intrinsischen sympathomimetischen Aktivität (ISA) und der Membranwirkung (MW) beim Betablocker-Absetzphänomen abzuschätzen, wurden folgende Betablocker bei diesen Versuchen verwendet:

BETA-ADRENOZEPTOR REGULATION DURCH NORADRENALIN

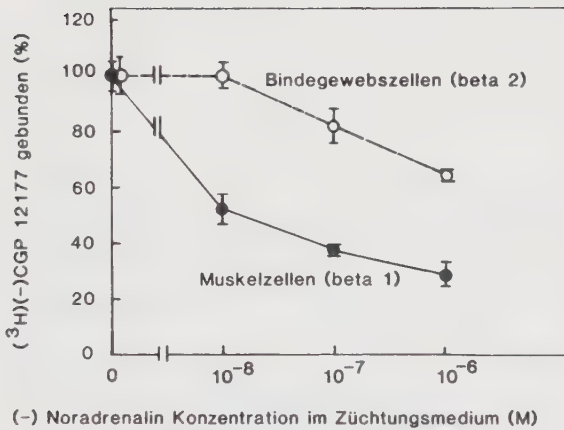


Abb.23:

Beta-Adrenozeptor-Regulation durch Noradrenalin

Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen wurden für 3 Tage in serumfreiem Medium bei verschiedenen (-)Noradrenalin-Konzentrationen inkubiert. Nach einer zweistündigen Waschperiode wurde die spezifische (^3H)(-)CGP 12177 Bindung in Herzmuskel- ($6 \times 10^{-10} \text{ M}$) und Herzbindegewebszellen ($2 \times 10^{-9} \text{ M}$) gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-5} M (-)Timolol ermittelt und von der Gesamtbindung subtrahiert. $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$, $n = 6$.

	ISA	MW
(-)Propranolol	-	+
(-)Timolol	(+)	-
(-)Pindolol	+	-

Eine vergleichbare Blockade der Beta-Adrenozeptoren durch die verschiedenen Betablocker wurde erreicht, indem in Verdrängungsexperimenten die Dissoziationskonstanten der Betablocker ermittelt wurden. Daraus lassen sich nach dem Massenwirkungsgesetz bei gegebener Konzentration die Rezeptorbesetzungen berechnen.

In den Experimenten, die in Abb.24 zusammengefaßt sind, wurden Herzmuskelzellen für 3 Tage in einem Inkubationsmedium gezüchtet, das (-)Propranolol, (-)Timolol oder (-)Pindolol in Konzentrationen enthielt, die zu einer 50,75 und 90%igen Rezeptorbesetzung führten. Nach Entfernen der zellgebundenen Betablocker wurde in anschließenden Bindungsstudien die (^3H)(-)CGP 12177-Bindung/mg Protein bestimmt. (-)Propranolol führt konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der (^3H)(-)CGP 12177-Bindung bis auf 170% des Ausgangswertes, die Züchtung in Gegenwart von (-)Timolol beeinflusst die Bindung nicht in signifikanter Weise, und die Inkubation mit (-)Pindolol vermindert die Bindung bis auf ca. 60-70% der Bindung der Kontrollzellen. In identisch durchgeführten Experimenten mit (+)Propranolol, dem d-Enantiomer von Propranolol, das zwar gleiche Membranwirkung, aber ca. 100-fach geringere Affinität zum Beta-Adrenozeptor wie (-)Propranolol besitzt (3.2.1.), konnte demonstriert werden, daß ca. 100-fach höhere Konzentrationen von (+) als von (-)Propranolol nötig sind, um eine vergleichbare Zunahme der (^3H)(-)CGP 12177-Bindung hervorzurufen.

Die durch (-)Propranolol induzierte Zunahme der Bindung ist auf eine Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren pro Zelle zurückzuführen, während sich die Bindungseigenschaften der Rezeptoren (K_D) dabei nicht verändern (Abb.25).

Eine Abnahme der Rezeptorzahl ohne signifikante Änderung der Bindungsaffinität wurde für Pindolol an anderen Zellarten demonstriert (27,128). Die Zahl der Beta-Adrenozeptoren pro Zelle wird also im katecholaminfreien System durch

ÄNDERUNG DER ZAHL DER BETA-ADRENOZEPTOREN UNTER BETA-BLOCKADE (3 TAGE)

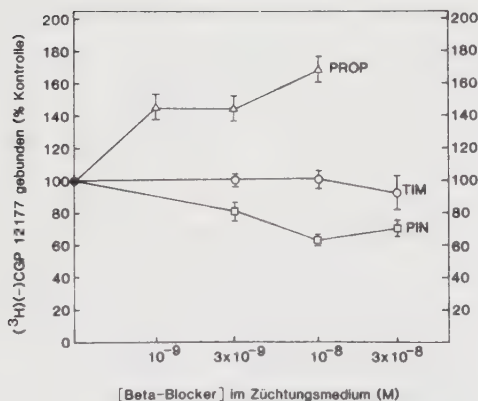


Abb.24

Änderung der Zahl der Beta-Adrenozeptoren unter Betablockade (3 Tage)

Herzmuskelzellen wurden für 3 Tage in serumfreiem Medium in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von (-)Propranolol, (-)Timolol oder (-)Pindolol kultiviert. Um die zellgebundenen Betablocker zu entfernen, wurden die Zellen anschließend für zwei Stunden in Betablocker-freiem Medium gespült. Danach wurde die spezifische (³H)(-)CGP 12177-Bindung gemessen.

Die Konzentrationen der Beta-Rezeptorenblocker, die für die Züchtung verwendet wurden, entsprechen ca. 50,75 bzw. 90% Rezeptorbesetzung, wie mittels der K_D-Werte der Tab.3 nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet wurde. $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$, n_D = 3-18.

EINFLUSS VON (-)PROPRANOLOL (10^{-8} M, 3 TAGE) AUF ZAHL UND AFFINITÄT
DER BETA-ADRENOCEPTOREN IN HÜHNER-HERZMUSKELZELLEN

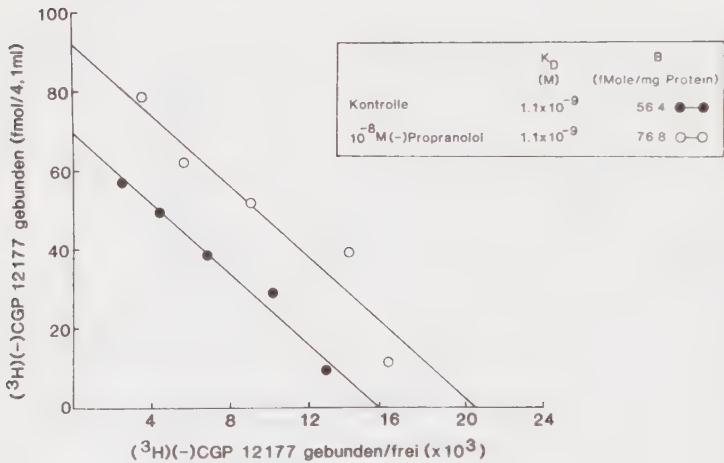


Abb.25:

Effekt von Propranolol (10^{-8} M) auf Zahl und Affinität der Beta-Adrenoceptoren in Hühner-Herzmuskelzellen

Die konzentrationsabhängige, spezifische (3 H)(-)CGP 12177 Bindung wurde in Kontrollzellen und in Zellen gemessen, die für 3 Tage in serumfreiem Medium in Gegenwart von 10^{-8} M (-)Propranolol gezüchtet worden waren. Die Bindungsdaten wurden nach Scatchard aufgetragen. Vor der Messung wurde das zellgebundene (-)Propranolol durch zweistündiges Spülen der Zellen entfernt.

Kontrolle: $r = -0,99$; 10^{-8} M (-)Propranolol; $r = -0,92$.

(-)Propranolol erhöht, durch (-)Timolol nicht signifikant verändert und durch (-)Pindolol vermindert.

Welche Bedeutung haben diese Veränderungen der Rezeptorzahl für die Ansprechbarkeit der Zellen gegenüber Beta-Adrenozeptor-Agonisten? Abb.26 zeigt ein Experiment, in dem nach dreitägiger Beta-Adrenozeptor-Blockade durch (-)Propranolol, (-)Timolol oder (-)Pindolol, bei jeweils ca. 90%iger Rezeptorbesetzung, die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung/mg Protein x min bestimmt wurde. Der Isoproterenol-Effekt ist nach Züchtung in (-)Propranolol erhöht, die Beta-Adrenozeptor-Empfindlichkeit ist also nach Absetzen von (-)Propranolol gesteigert. Exposition der Zellen in Gegenwart von (-)Timolol verändert demgegenüber die Ansprechbarkeit der Zellen nicht signifikant, während dreitägige (-)Pindolol-Behandlung sogar zu einer verringerten Isoproterenol-stimulierten cAMP-Bildung führt.

Die positiv inotrope Wirkung von Isoproterenol nach Absetzen der Betablockade steht in Übereinstimmung mit der cAMP-Produktion nach Betablocker-Entzug (Abb.27): Herzmuskelzellen, die in Gegenwart von $10^{-8}M$ (-)Propranolol inkubiert wurden, zeigen gegenüber Kontrollzellen eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve und einen gesteigerten Maximaleffekt. Züchtung in (-)Timolol ($10^{-8}M$) verursacht eine leichte, aber nicht signifikante Abschwächung des Isoproterenol-Effektes. (-)Pindolol ($3 \times 10^{-8}M$)-Züchtung der Zellen schwächt dagegen die Beta-Adrenozeptor-Empfindlichkeit stark ab. Ein Betablocker-Absetzphänomen läßt sich im katecholaminfreien Zellkultursystem also nur nach Absetzen von (-)Propranolol nachweisen. Die gesteigerte Katecholaminempfindlichkeit geht mit einer Zunahme der Rezeptorzahl einher.

3.2.4. Bedeutung von Noradrenalin beim Betablocker-Absetzphänomen

Wegen des Fehlens der Stimulation und konsekutiver Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren durch endogene Katecholamine spiegelt das in 3.2.3. beschriebene Zellmodell die in vivo-Situation nur unvollständig wider. Durch Zusatz von (-)Noradrenalin zum Züchtungsmedium wurde versucht, eine Annäherung an die physiologische Situation zu erreichen (3.2.2.).

ISOPROTERENOL-STIMULIERTE cAMP-BILDUNG NACH ABSETZEN
EINER BETA-BLOCKADE IN HERZMUSKELZELLEN

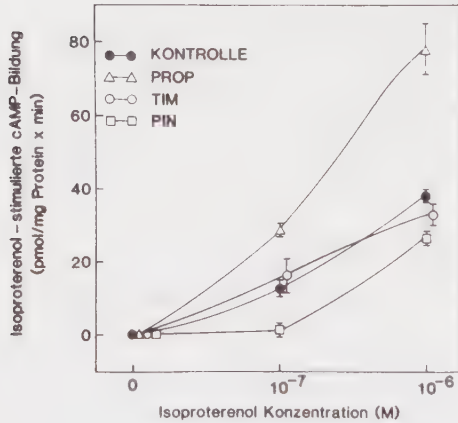


Abb.26:

Effekt von Isoproterenol auf die cAMP-Bildung nach Absetzen einer Beta-Blockade in Herzmuskelzellen

Herzmuskelzellen wurden für 3 Tage in serumfreiem Züchtungsmedium in Gegenwart von (-)Propranolol, (-)Timolol bzw. (-)Pindolol kultiviert. Die Konzentrationen der Betablocker repräsentieren 75-90% Rezeptorbesetzungen, wie mittels der K_D -Werte der Tab.3 nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet wurde.

Nach Entfernen der zellgebundenen Betablocker durch zweistündiges Spülen der Zellen wurde die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung/mg Protein x min bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach Vorinkubation mit 10^{-5} M IBMX (15min) für 2min bei verschiedenen Isoproterenol-Konzentrationen inkubiert. Die basale cAMP-Bildung in Abwesenheit von Isoproterenol ($9,9 \pm 0,2$ pmol/mg Protein) wurde subtrahiert. $\bar{x} \pm S.E.M.$, n = 4.

ISOPROTERENOL-EFFEKT NACH ABSETZEN EINER BETA-BLOCKADE IN HERZMUSKELZELLEN

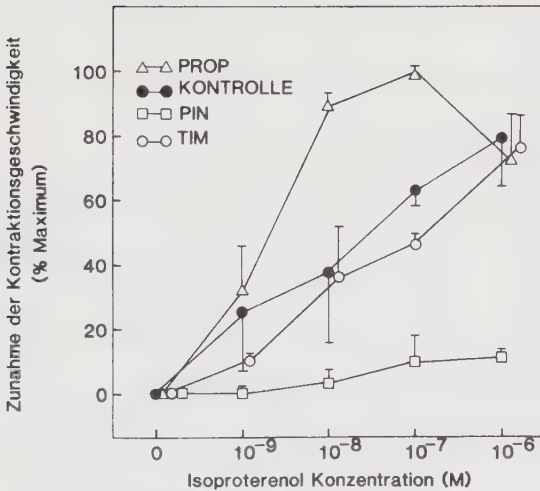


Abb.27:

Isoproterenol-Effekt nach Absetzen einer Betablockade in Herzmuskelzellen

Herzmuskelzellen wurden für 3 Tage in Gegenwart von (-)Propranolol, (-)Timolol bzw. (-)Pindolol in Konzentrationen 75-90%iger Rezeptorbesetzung gezüchtet (siehe Abb.24). Nach zweistündigem Spülen der Herzmuskelzellen in Betablocker-freiem Medium wurden die Zellen mit steigenden Isoproterenol-Konzentrationen durchströmt ($[Ca^{2+}] = 0,9mM$) und elektrisch stimuliert ($120min^{-1}$).

Die Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit wurde in Prozent gegenüber einem Maximaleffekt aufgetragen, der bei $3,6mM Ca^{2+}$ erreicht und als 100% gesetzt wurde. $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

In den Experimenten der Abb.28 wurde die Beta-Adrenozeptor-Regulation durch Betablocker im (-)Noradrenalin-haltigen System untersucht. Nach dreitägiger Inkubation der Herzmuskelzellen bei verschiedenen (-)Noradrenalin-Konzentrationen liegt die Rezeptorzahl, repräsentiert durch die spezifische (^3H) (-)CCP 12177-Bindung, in konzentrationsabhängiger Weise vermindert vor (). Zusatz von (-)Propranolol (10^{-8}M) verursacht bei allen (-)Noradrenalin-Konzentrationen im Kulturmedium eine Zunahme der Rezeptorzahl, hervorgerufen durch die Blockade der Noradrenalin-induzierten Rezeptor-Down-Regulation (). (-)Pindolol dagegen entfaltet in Abhängigkeit von der vorgegebenen (-)Noradrenalin-Konzentration unterschiedliche Effekte (): Im (-)Noradrenalin-freien System vermindert (-)Pindolol die (^3H) (-)CCP 12177-Bindung gegenüber Kontrollzellen um ca. 20%. Je mehr nun die Rezeptoren durch (-)Noradrenalin aber bereits down-reguliert vorliegen, desto weniger führt (-)Pindolol zur Abnahme der Rezeptoren. Schließlich kommt es sogar zur Zunahme der Beta-Adrenozeptoren, so daß sich letztendlich in Gegenwart von 10^{-7}M (-)Noradrenalin die (-)Pindolol-induzierte Rezeptor-Zunahme nicht mehr wesentlich von der unterscheidet, die durch (-)Propranolol hervorgerufen wird. Das Experiment demonstriert, daß eine Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren auch durch Betablocker mit ISA hervorgerufen werden kann. Der Anstieg der Rezeptorzahl durch die Betablockade nimmt mit steigenden (-)Noradrenalin-Konzentrationen zu.

3.2.5. Selektive Beta₁- und Beta₂-Adrenozeptor Regulation durch Betablocker

Beim Betablocker-Absetzphänomen kommt den Beta₁-Adrenozeptoren des Herzens die entscheidende Bedeutung zu (102,143). Die Bedeutung von Beta₂-Adrenozeptoren, z.B. der Blutgefäße, der Lunge oder des Herzens, für das Auftreten eines Betablocker-Absetzphänomens, ist weitgehend ungeklärt (39,102). Die Trennung von Muskel- und Bindegewebszellen des Herzens in der Zellkultur bietet die Möglichkeit, die Regulation kardialer Beta₁- und Beta₂-Adrenozeptoren getrennt zu untersuchen (32,108):

In Abb.29 ist die Wirkung von $3 \times 10^{-8}\text{M}$ (-)Pindolol auf die Regulation der

BEDEUTUNG VON NORADRENALIN FÜR DIE REZEPTOR-REGULATION DURCH BETA-BLOCKER

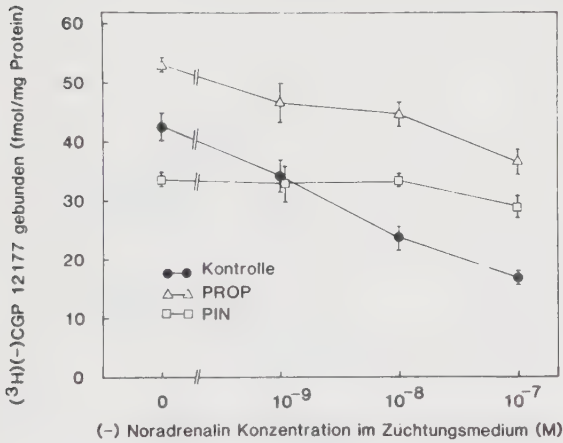


Abb. 28:

Bedeutung von Noradrenalin für die Rezeptor-Regulation durch Betablocker

Der Effekt einer dreitägigen Inkubation der Herzmuskelzellen mit verschiedenen Betablockern auf die spezifische $(^3\text{H})(-)\text{CGP 12177}$ Bindung wurde bei verschiedenen $(-)\text{Noradrenalin}$ -Konzentrationen in einem serumfreien Kulturmedium untersucht. Die Zellen wurden in Gegenwart von 10^{-8} M $(-)\text{Propranolol}$ ($\Delta-\Delta$), $3 \times 10^{-8}\text{ M}$ $(-)\text{Pindolol}$ ($\square-\square$) (je 90% Rezeptorbesetzung, siehe Abb. 24) oder in Betablocker-freiem Zuchtungsmedium ($\bullet-\bullet$) bei verschiedenen $(-)\text{Noradrenalin}$ -Konzentrationen kultiviert. Nach einer Waschperiode von zwei Stunden wurde die spezifische $(^3\text{H})(-)\text{CGP 12177}$ Bindung ($6 \times 10^{-10}\text{ M}$) bestimmt. $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

BETA-ADRENOZEPTOR REGULATION IN HERZZELLEN

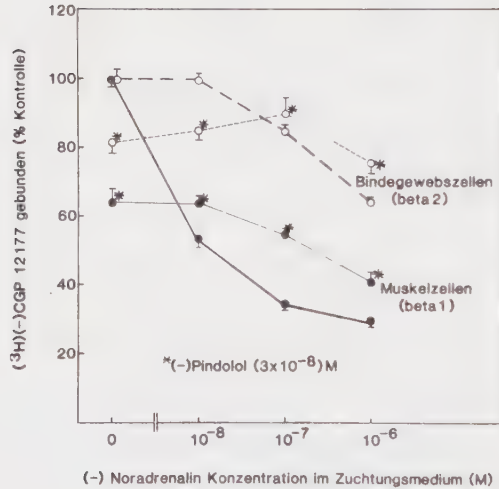


Abb. 29:

Beta-Adrenozeptor Regulation in Herzzellen

Die Wirkung der Kultivierung von Hühner-Herzzellen in 3×10^{-8} M (-)Pindolol auf die (^3H) (-)CGP 12177-Bindung wurde bei verschiedenen (-)Noradrenalin-Konzentrationen im Zuchtungsmedium untersucht. Herzmuskelzellen wurden für drei Tage in Abwesenheit (●●) oder Gegenwart (●●●) von (-)Pindolol bei $0-10^{-6}$ M (-)Noradrenalin in serumfreiem Kulturmedium inkubiert. Herzbindegewebszellen wurden in gleicher Weise ohne (○○) bzw. mit (○●○) (-)Pindolol in einem Medium gezüchtet, das $0-10^{-6}$ M (-)Noradrenalin enthielt. (-)Noradrenalin veränderte den Proteingehalt pro Kulturfläschchen in beiden Zellarten nicht.

Im Anschluß an eine Wascheriode von 2 Stunden wurde die spezifische (^3H) (-)CGP 12177-Bindung in Muskel- (6×10^{-10} M) und Bindegewebszellen (2×10^{-9} M) gemessen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollzellen berechnet, die in Abwesenheit von (-)Noradrenalin und (-)Pindolol kultiviert worden sind.

$\bar{x} \pm$ S.E.M., n = 6

Beta₁-Adrenozeptoren von Hühnerherzmuskelzellen und der Beta₂-Adrenozeptoren von Hühnerherzbindegewebszellen dargestellt. Die Zellen wurden 3 Tage in Gegenwart oder Abwesenheit von (-)Pindolol in einem serumfreien Züchtungsmedium inkubiert, das verschiedene (-)Noradrenalin-Konzentrationen enthielt.

Anschließend wurde durch (³H)(-)CGP 12177-Bindung die Zahl der Beta-Adrenozeptoren in Muskel- und Bindegewebszellen gemessen. In Abwesenheit von (-)Pindolol liegen die Beta₁-Adrenozeptoren der Herzmuskelzellen (●●) durch das beta₁-selektive (-)Noradrenalin in wesentlich stärkerem Maße down-reguliert vor als die Beta₂-Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen (○○).

Betrachtet man den Effekt von (-)Pindolol an Muskel- (●●*) und Bindegewebszellen (○○*), so zeigt sich folgendes Ergebnis:

Im (-)Noradrenalin-freien System vermindert (-)Pindolol die (³H)(-)CGP 12177-Bindung in beiden Zellarten um 20-40%. In Gegenwart von 10⁻⁸M (-)Noradrenalin führt (-)Pindolol dagegen zu einer Zunahme der Beta₁-Adrenozeptoren, die durch (-)Noradrenalin um ca. 50% vermindert vorliegen. Die Zahl der Beta₂-Adrenozeptoren, die durch 10⁻⁸M (-)Noradrenalin noch nicht down-reguliert ist, nimmt jedoch durch die Wirkung des (-)Pindolol ab. In Gegenwart einer sehr hohen (-)Noradrenalin-Konzentration induziert (-)Pindolol eine Zunahme von Beta₁- und Beta₂-Adrenozeptoren, da beide durch (-)Noradrenalin bereits down-reguliert vorliegen.

Das Experiment verdeutlicht, daß die Wirkung von (-)Pindolol auf die Zahl der Beta₁- und Beta₂-Adrenozeptoren vom Grad der basalen, (-)Noradrenalin-induzierten Rezeptor-Down-Regulation abhängt. In Abwesenheit von (-)Noradrenalin im Kulturmedium bewirkt (-)Pindolol aufgrund seiner intrinsischen sympathomimetischen Aktivität eine Abnahme sowohl der Zahl der Beta₁- als auch der Beta₂-Adrenozeptoren. Bei physiologischen (-)Noradrenalin-Konzentrationen (10⁻⁸M) führt (-)Pindolol dagegen zu einer Zunahme der Beta₁-, aber zu einer Abnahme der Beta₂-Adrenozeptoren, da die Beta-Adrenoceptor-Subtypen durch (-)Noradrenalin in unterschiedlichem Maße down-reguliert vorliegen.

4. DISKUSSION

4.1. Herzglykosid-Toleranz

4.1.1. Herzglykosid-Rezeptoren kultivierter Herzmuskelzellen

Voraussetzung zum Studium der Regulationsmechanismen des Herzglykosid-Rezeptors ist die quantitative Charakterisierung der Herzglykosid-Rezeptorbindung und die Korrelation der Pharmakonbindung mit der zellbiologischen bzw. pharmakologischen Wirkung. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, unter annähernd identischen Bedingungen die Reaktionskette der Herzglykosidwirkung in schlagenden Herzmuskelzellen von Hühnerembryonen in quantitativer Weise zu beschreiben: Kultivierte Hühner-Herzmuskelzellen besitzen eine einheitliche Klasse von Bindungsstellen (Abb.6), an die Herzglykoside spezifisch und mit hoher Affinität binden (Tab.1). Die Bindung des Herzglykosids Strophanthin führt zur Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports über die Zellmembran, zum Abfall des zellulären Kalium-Gehaltes und zum Anstieg des Zell-Natriums (Abb.7,12). Die Strophanthin-induzierte Zunahme der Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb.8) läßt sich mit einer positiv inotropen Wirkung vergleichen (86,93). Die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren pro Zelle beträgt ca. 750.000, während nur ca. 5000 Beta-Adrenozeptoren pro Herzmuskelzelle vorhanden sind (3.2.1.).

Eine positiv inotrope Wirkung wird in Hühner-Herzmuskelzellen meßbar, wenn mehr als ca. 20% der Herzglykosid-Rezeptoren mit Strophanthin besetzt sind. Toxische Effekte (Arrhythmien) lassen sich bei einer Rezeptorbesetzung $\geq 60\%$ nachweisen (Abb.8). Im Unterschied dazu können jedoch 50% der Rezeptoren mit Strophanthin abgesättigt sein, ohne daß eine meßbare Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports oder ein höhergradiger Abfall des Zell-Kaliums erzielt wird (Abb.7). Das Fehlen eines linearen Zusammenhangs zwischen Glykosidbindung und Enzymaktivität steht jedoch nicht in Widerspruch zur klassischen Theorie der kausalen Verknüpfung von Pumphemmung und positiv inotroper Wirkung (131,135). Es wird erklärt durch die gesteigerte Pumpaktivität der nicht gehemmten Natriumpumpmoleküle (4,5,200). Durch diese Pumpreserve wird im therapeutischen Konzentrationsbereich trotz nachgewiesener geringer Verminderung der Natriumpumpaktivität (109,174) die

zelluläre Na^+/K^+ -Homöostase nicht höhergradig gestört, und die nur geringe Hemmung des aktiven Kationentransportes entgeht der Erfassung durch Tracerstudien (185,186,191).

4.1.2. Herzglykosid-Toleranz in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

Eine Verminderung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes durch eine partielle Hemmung des Transportes durch Herzglykoside würde zu einer Beeinträchtigung der zellulären Na^+/K^+ -Homöostase führen. Dies kann von der Herzmuskelzelle durch eine kompensatorische Zunahme der Zahl der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle pro Zelle verhindert werden (Abb.16). Für die Pharmakodynamik der Herzglykoside gewinnt dieser Adaptationsmechanismus eine besondere Bedeutung: Da der Herzglykosid-Rezeptor Bestandteil des $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküls ist, führt eine Zunahme der Zahl der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle nicht nur zu einer Steigerung der maximalen Transportkapazität ohne Änderung der Michaelis-Konstante (Abb.14), sondern auch zu einer Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren gleichen Ausmaßes, ohne deren Bindungseigenschaften zu verändern (Abb.13). Falls die Hemmung des aktiven $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -Transportes ursächlich für die positiv inotrope und die toxische Wirkung der Herzglykoside verantwortlich sein sollte - was allerdings nicht unumstritten ist (74-76,116,117) - dann ist von einer geänderten Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren / $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle auch eine geänderte Pharmakodynamik der Herzglykoside zu erwarten. Dies wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der chronischen Strophanthin-Exposition kultivierter Hühner-Herzmuskelzellen nachgewiesen: Die Züchtung der Herzmuskelzellen in Gegenwart hoher Strophanthin-Konzentrationen führt zur Toleranzentwicklung sowohl bezüglich der toxischen (Abb.9) als auch bezüglich der positiv inotropen Wirkung (Abb.10,11). Diese Toleranzentwicklung läßt sich eindeutig auf die Zunahme der Zahl der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle/Herzglykosid-Rezeptoren zurückführen, mit der die Herzmuskelzelle die herzoglykosidinduzierte Hemmung des aktiven $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -Transportes kompensiert (Abb.16). Dieser Kompensationsvorgang dient ursächlich der

Wiederherstellung der gestörten Na^+/K^+ -Homöostase (Abb.12). Daß eine Zunahme der Zahl der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle pro Herzmuskelzelle zur Herzglykosid-Toleranzentwicklung führt, macht eine Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes als Ursache der positiv inotropen Wirkung der Herzglykoside sehr wahrscheinlich - wie bereits von Smith u.Mitarbeiter (96) betont - und ist mit allen anderen postulierten Mechanismen (74-76,116,117) nur schwer in Einklang zu bringen.

Die Zunahme der Zahl der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle läßt sich nicht nur durch chronische Strophanthin-Exposition kultivierter Herzmuskelzellen erreichen. Sie stellt vielmehr einen generellen Kompensationsmechanismus der Zelle dar, einer Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes entgegenzuwirken, die auch durch eine Erniedrigung der extrazellulären K^+ -Konzentration (96,188,193,194) oder durch einen Veratridin-induzierten Anstieg des Na^+ -Influx in die Zellen (96) ausgelöst werden kann. Dieser Adaptationsmechanismus wird durch einen Anstieg der intrazellulären Na^+ -Ionen getriggert (96). Er benötigt einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden und ist innerhalb derselben Zeitspanne reversibel (Abb.12). Der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid verhindert die Strophanthin-induzierte Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren (3.1.3.). Daher stellt der Adaptationsprozeß wahrscheinlich eine Neusynthese zusätzlicher Natriumpumpmoleküle oder einen verlangsamten Abbau des Enzyms dar. Zum Auftreten einer Herzglykosid-Toleranzentwicklung kommt es aber nur in Gegenwart toxischer, nicht aber in Gegenwart therapeutischer, nicht toxischer, Strophanthin-Konzentrationen (Abb.10,11). Mindestens 50% der Natriumpumpmoleküle müssen während der chronischen Strophanthin-Exposition inaktiviert sein, um eine Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren zu initiieren (Abb.16). Diese hohen Strophanthin-Konzentrationen stellen den toxischen, arrhythmogenen Wirkungsbereich der Herzglykoside dar (Abb.8). Bei Inaktivierung von weniger als 50% der Pumpmoleküle, im Bereich der positiv inotropen Herzglykosidwirkung, wird die herzglykosidinduzierte Störung der Na^+/K^+ -Homöostase durch einen zweiten Adaptationsmechanismus der Herzmuskelzelle ausreichend kompensiert, nämlich die Steigerung der Transportkapazität der nicht gehemmten

Natriumpumpmoleküle. Durch diese Pumpreserve der Herzmuskelzelle kommt es bei einer Rezeptorbesetzung bis zu ca. 50% noch zu keiner höhergradigen Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes und zu keiner ausgeprägten Störung der Na^+/K^+ -Homöostase (Abb.5, Abb.16;185,186). Erst eine Erschöpfung der Pumpreserve und ein entsprechender Anstieg des intrazellulären Na^+ -Gehaltes bewirkt einen Anstieg der Zahl der Natriumpumpmoleküle mit konsekutiver Entwicklung einer Herzglykosid-Toleranz.

Im Gegensatz dazu reicht offensichtlich ein geringerer Grad der Inaktivierung von Natriumpumpmolekülen (20-50% Rezeptorbesetzung) mit weniger ausgeprägtem Anstieg des intrazellulären Na^+ -Gehaltes aus, um einen positiv inotropen Effekt zu erzielen (Abb.8). Der Anstieg des intrazellulären Na^+ bei positiv inotroper Herzglykosidwirkung erreicht aber nicht den Schwellenwert zur Auslösung einer Zunahme der Zahl der Natriumpumpmoleküle. Die Entwicklung einer Herzglykosid-Toleranzentwicklung ist daher an das Auftreten toxischer Herzglykosidwirkungen gebunden.

4.1.3. Vergleich tierexperimenteller- und Zellkulturstudien bei der Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden

Greeff und Mitarbeiter (16,21) nahmen sich des Problems der Toleranzentwicklung bei Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden als erste an. Sie maßen bei der Behandlung von Meerschweinchen mit Digitoxin ab dem 7. Behandlungstag einen Anstieg der kardialen (Na^+/K^+)-ATPase-Aktivität um 30%. Dieser Befund würde in Betrachtung der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse mit der Entwicklung einer Herzglykosid-Toleranz übereinstimmen. Ähnliche Befunde erhielten auch Whittacker und Swaminathan (198) bei Schweinen nach vierzehnwöchiger Digoxin-Behandlung. Die Mehrzahl der Untersucher (47,103,132, Überblick in 192) fand jedoch bei Hunden und Katzen, die für einen Zeitraum von bis zu 4 Monaten mit Herzglykosiden behandelt worden waren, weder einen Anstieg der myokardialen (Na^+/K^+)-ATPase-Aktivität noch der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren. Ihre Ergebnisse sprachen daher gegen eine Abschwächung der Herzglykosidwirkung bei Langzeitbehandlung.

Eine Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren bzw. eine erhöhte ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität bei chronischer Herzglykosidexposition wurde aber auch an anderen Zellarten wie menschlichen Tumorzellen (17,140), Schweine-Erythrozyten (197) und Ratten-Hepatozyten (114) beobachtet. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, daß die bei verschiedenen Erkrankungen auftretende Zu- oder Abnahme der Herzglykosid-Rezeptorendichte bei verschiedenen Zellarten der gleichen Spezies beträchtliche Unterschiede aufweisen kann (Überblick in 31). So war bei chronisch hypokaliämischen Meerschweinchen die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren an den Erythrozyten um 140% erhöht, am Herzen jedoch unverändert und am Skelettmuskel sogar um 33% erniedrigt (30). In kultivierten Hühner-Herzzellen nahm bei Züchtung der Zellen in kaliumarmem Medium die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren der Herzmuskelzellen erst bei stark erniedrigter Kaliumkonzentration (1.5mM) zu, während die Rezeptorzahl der Herzbindegewebszellen bereits bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3mM deutlich erhöht war (188). Diese Ergebnisse belegen, daß Adaptationsmechanismen bei chronischer Herzglykosidexposition oder Hypokaliämie an anderen Zellarten sich von denen der Herzmuskelzellen gänzlich unterscheiden können. Studien an anderen Zellarten dürfen daher nur mit größtem Vorbehalt auf das Herz übertragen werden (31).

4.1.4. Vergleich der an Zellkulturen erhaltenen Befunde mit klinischen Studien bei der Langzeit-Digitalistherapie herzinsuffizienter Patienten mit Sinusrhythmus

Die Frage der Toleranzentwicklung bei der Behandlung mit Herzglykosiden ist in einer Vielzahl klinischer Studien untersucht worden. Für den AV-Überleitungsblockierenden Effekt der Herzglykoside bei der Behandlung des tachysystolischen Vorhofflimmerns und Vorhofflatterns gibt es keinen Hinweis für eine Abschwächung der Wirkung bei Langzeitgabe (80). Bei der kontraktionskraftsteigernden Wirkung zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz bei Sinusrhythmus ist die Situation jedoch unklar. Um die positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside bei Langzeitbehandlung chronisch herzinsuffizienter Patienten mit Sinusrhythmus beantworten zu können, muß aber folgende Forderung erfüllt sein: Nur wenn im

Akutversuch die pharmakologische Wirkung nachgewiesen ist, kann bei chronischer Gabe die Abschwächung der Wirkung dokumentiert werden. Betrachtet man die Studien, die diese Forderung erfüllen, so kommt die Mehrzahl der Autoren zu dem Schluß, daß die positiv inotrope Herzglykosidwirkung auch bei Langzeitbehandlung bis zu mehreren Monaten nicht abgeschwächt wird. Dies gilt sowohl für gesunde Probanden, für herzkrankte Patienten ohne manifeste Herzinsuffizienz als auch für Patienten mit höhergradiger Herzinsuffizienz (44,65,89,99,167,171). Im Gegensatz dazu wird nur in wenigen Untersuchungen eine Abschwächung der positiv inotropen Herzglykosidwirkung bei Langzeitbehandlung beschrieben (42,175).

Der anhaltende positiv inotrope Effekt ist jedoch nur notwendige Voraussetzung nicht aber gleichzusetzen mit einer anhaltenden therapeutisch günstigen Wirkung bei chronisch herzinsuffizienten Patienten mit Sinusrhythmus. Daher muß ein besonderes Interesse auf die Studien gelegt werden, in denen die Wirksamkeit der Herzglykosidmedikation auch durch die Besserung der klinischen Symptomatik der herzinsuffizienten Patienten im Akutversuch abgesichert und während der Langzeitbehandlung weiter verfolgt wurde. Die Untersuchungen von Arnold et al. (9) und Lee et al. (110) sind diesbezüglich von besonderem Interesse. In diesen Studien wurden bei 9 bzw. 25 chronisch herzinsuffizienten Patienten mit Sinusrhythmus (NYHA Grad II-III) hämodynamische Parameter (z.B. Herzindex, Pulmonalkapillardruck) und klinische Herzinsuffizienzsymptomatik im intravenösen Digoxin-Akutversuch sowie während und nach Absetzen der oralen Dauertherapie bis zu 10 Wochen untersucht. Bei den Patienten, bei denen die Digoxin-Behandlung akut eine therapeutisch günstige Wirkung gezeigt hatte, konnte auch unter Digoxin-Dauerbehandlung eine anhaltende Besserung der Herzinsuffizienzsymptomatik festgestellt werden. Zusammenfassend kann aus diesen Studien der Schluß gezogen werden, daß bei überschaubarer Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden weder der positiv inotrope Effekt noch die darauf basierende therapeutisch günstige Wirkung abgeschwächt wurden. Eine Toleranzentwicklung bei Langzeitbehandlung trat also bei therapeutischer Dosierung nicht auf.

Neben diesen klinischen Untersuchungen müssen auch Messungen der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren und des Kationentransportes in Erythrozyten chronisch

digitalisierter Patienten in die Diskussion einbezogen werden: Erdmann et al. (61) konnten bei gesunden Probanden während dreimonatiger Digoxin-Einnahme keine Zunahme der Zahl der erythrozytären Herzglykosid-Rezeptoren nachweisen. Dagegen berichteten Cumberbatch et al. (41) über einen Anstieg der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität und des Natrium-Efflux sowie über einen Abfall der initial erhöhten Natriumkonzentration in Erythrozyten von 39 digitalisierten Patienten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Ford et al. (66,67) bei 46 chronisch digitalisierten Patienten: Der aktive Kaliumtransport und die Digoxin-Bindungskapazität der Erythrozyten, die während der initialen Digoxin-Behandlung vermindert waren, normalisierten sich im weiteren Verlauf der Therapie; die anfänglich erhöhte zelluläre Na^+ -Konzentration fiel wieder ab. Diese Adaptationsvorgänge sind mit einer Zunahme der Zahl der erythrozytären Natriumpumpmoleküle während der Digoxin-Langzeitbehandlung zu erklären. Auf das Herz übertragen würde dieser Befund mit einer Herzglykosid-Toleranzentwicklung auch in Gegenwart therapeutischer Glykosidkonzentrationen übereinstimmen. Allerdings ist, wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, die Übertragung der Erythrozytenbefunde auf das Herz nicht gerechtfertigt. Denn im Gegensatz zur Herzmuskelzelle besitzt der Erythrozyt keine Natriumpumpreserve, was möglicherweise mit der weitaus geringeren Dichte der erythrozytären $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle auf der Zellmembran zu erklären ist (31). Daher stellt der Erythrozyt kein geeignetes Modell zum Studium der Herzglykosid-Toleranz dar.

4.1.5. Klinische Schlußfolgerungen

Aus den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen an Hühner-Herzmuskelzellen kann eindeutig der Schluß gezogen werden, daß eine Toleranzentwicklung der positiv inotropen und toxischen Wirkung bei der Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden auftreten kann (3.1.2.). Allerdings kommt es nur in Gegenwart toxischer, nicht aber in Gegenwart therapeutischer, positiv inotroper, Glykosidkonzentrationen zu Abschwächung der Herzglykosidwirkung (3.1.4.). Auch in der Mehrzahl der tierexperimentellen Studien (4.1.3.) tritt bei Langzeit-

behandlung mit nicht-toxischen Konzentrationen keine Herzglykosidtoleranz auf. Sind diese an Hühner-Herzmuskelzellen erhobenen Befunde auch auf die Herzglykosid-Langzeitbehandlung chronisch herzinsuffizienter Patienten mit Sinusrhythmus übertragbar? Da Herzglykoside ihre positiv inotrope und toxische Wirkung sowohl in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen als auch am menschlichen Herzen über denselben Wirkungsmechanismus entfalten, gibt es derzeit keinen experimentell begründeten Anlaß, die Relevanz dieser Befunde in Frage zu stellen. Daraus kann die Schlußfolgerung abgeleitet werden, daß bei einer nebenwirkungsfreien Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden nicht mit einer Toleranzentwicklung zu rechnen ist. Die Mehrzahl der klinischen Studien bestätigt dies: Sowohl der positiv inotrope Effekt als auch die darauf basierende therapeutische Wirkung bleiben bei Herzglykosid-Langzeitmedikation erhalten (4.1.4.).

Eine Herzglykosid-Toleranzentwicklung bei einer mittleren therapeutischen Dosierung scheidet also als Ursache eines Therapieversagens aus. Sollten allerdings zur Behandlung des tachysystolischen Vorhofflimmerns oder Vorhofflatterns sehr hohe Dosierungen erforderlich sein, so muß aufgrund unserer in vitro-Befunde mit einer Abschwächung der positiv inotropen Herzglykosidwirkung gerechnet werden. Das Auftreten einer Toleranzentwicklung bei sehr hohen Dosierungen muß daher als weiteres Argument für eine strenge Indikationsstellung der Langzeitbehandlung mit Herzglykosiden angesehen werden.

4.2. Betablocker-Absetzphänomen

4.2.1. Beta-Adrenozeptoren kultivierter Herzmuskelzellen

Das Beta-Adrenoceptor-Adenylatzyklassesystem schlagender Herzzellen in Kultur ist von einer Reihe von Arbeitsgruppen ausführlich charakterisiert worden (18,19,91,120,142). Auch in unseren Experimenten konnte gezeigt werden, daß Herzmuskelzellen von Hühnerembryonen eine einheitliche Klasse von Beta-Adrenozeptoren mit einer Rezeptordichte von ca. 5000 Beta-Adrenozeptoren pro Zelle besitzen (Abb.17). Die Bindung von Beta-Adrenoceptor-Agonisten, z.B. Isoproterenol, führt zur Bildung von zyklischem AMP und zur Steigerung der Kontraktionsgeschwindigkeit der Zellen; eine positiv chronotrope Wirkung wurde dagegen nicht gefunden (Abb.18,19). Die fehlende Ansprechbarkeit der Schlagfrequenz auf Isoproterenol in Hühner-Herzmuskelzellen wurde auch von einigen Arbeitsgruppen bestätigt (10,118), während andere einen Anstieg der Kontraktionsfrequenz nachweisen konnten (179,180). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Effekte kann derzeit nicht gegeben werden.

Durch Verdrängungsstudien mit selektiven Liganden konnten die Beta-Adrenozeptoren von Hühner-Herzmuskelzellen als Beta_1 -Adrenozeptoren klassifiziert werden (Tab.3). Dieser schon von anderen Autoren beschriebene Befund (91,120) widerspricht experimentellen Ergebnissen an Membranhomogenaten und Papillarmuskelstreifen menschlicher Herzen, an denen positiv inotrope und chronotrope Wirkungen auch über kardiale Beta_2 -Adrenozeptoren vermittelt werden. Die Beta_2 -Adrenozeptoren sollen ca. 20-40% myokardialer Beta-Adrenozeptoren ausmachen (25,26,168,201). An Herzzellen verschiedener Tiespezies konnte jedoch demonstriert werden, daß Beta_2 -Adrenozeptoren nur in Bindegewebs- und Endothelzellen des Herzens vorkommen (32,108), die von Marvin als "non-muscle cells" subsumiert wurden (122). Auch in unseren Experimenten konnten die Beta-Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen dem Beta_2 -Subtyp zugeordnet werden (Tab.3). Kürzlich wurde von Wallukat und Wollenberger (180) in Ratten-Herzmuskelzellen eine positiv chronotrope Wirkung über Beta_2 -Adrenozeptoren nachgewiesen. Eine abschließende Wertung über das Vorhandensein

von Beta_2 -Adrenozeptoren in kultivierten Herzmuskelzellen kann aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht getroffen werden (194). Nicht-selektive Beta-Adrenozeptor-Agonisten und -Antagonisten binden an Beta-Adrenozeptoren von Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen mit gleicher Affinität und stereoselektiv. Die Dissoziationskonstanten der Agonisten unter Gleichgewichtsbedingungen liegen bei unseren Meß- und Versuchsbedingungen 10-100-fach höher als die für sympathomimetische Effekte nötigen Konzentrationen, die während jeweils dreiminütiger Inkubationsperioden gemessen wurden (Abb.19,Tab.3). Dieser bereits in anderen Studien beschriebene Befund wurde von Marsh und Smith (120) mit der während der Inkubation unter Gleichgewichtsbedingungen auftretenden Agonist-induzierten Desensibilisierung erklärt.

4.2.2. Beta-Adrenozeptor-Desensibilisierung

Die Beta-Adrenozeptor-Desensibilisierung an intakten Herzmuskelzellen ist von verschiedenen Arbeitsgruppen ausführlich untersucht worden (13,18,19,113,118, 121) und konnte auch in unseren Experimenten an Hühner-Herzzellen nachgewiesen werden: Innerhalb einer Stunde führt die Exposition mit Beta-Adrenozeptor-Agonisten zur Verminderung der Rezeptorzahl, die nach Zugabe von Betablockern innerhalb von 24 Stunden reversibel ist (Abb.21).

Bei dieser Agonist-induzierten Desensibilisierung kommt es zunächst zur Änderung der Affinität des Rezeptors zum Agonisten und zwar über eine Transformierung der Rezeptoren von einem "high affinity state" in ein "low affinity state".

Schließlich werden die Beta-Adrenozeptoren teilweise von der Oberfläche der Zellmembran in die Zelle sequestriert: die Zahl funktionell aktiver Rezeptoren nimmt ab (Übersicht bei 82,111,157,169). Ob auch eine Veränderung im Bereich der regulatorischen Untereinheit der Adenylatzyklase eine Rolle spielt, ist bislang nicht geklärt (111,157).

Die Transformierung der Rezeptoren in eine niederaffine Bindungskonformation kommt dabei innerhalb von Minuten ohne Änderung der Rezeptorzahl zustande (118,120). Innerhalb weniger Stunden ist auch die Agonist-induzierte Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren abgeschlossen (18,19,91,118,121)

(Abb.21). Während in Hühner-Herzmuskelzellen die Down-Regulation durch den Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid nicht gehemmt werden kann, dürfte es sich bei der Betablocker-induzierten Up-Regulation um einen Prozeß der Rezeptor-Neusynthese handeln (121). Diese Befunde sind allerdings nicht unumstritten. Von Nickols und Brooker (134) wurde in Astrozytomazellen eine Hemmung der Agonist-induzierten Desensibilisierung durch Cycloheximid beobachtet. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichteten Limas und Limas (113) nach Desensibilisierung myokardialer Beta-Adrenozeptoren von neugeborenen Ratten über eine rasche Wiederherstellung der Funktion (20min).

Obwohl das quantitative Ausmaß der Down-Regulation weder für Beta_1 - noch für Beta_2 -Adrenozeptoren bekannt ist, kann als gesichert gelten, daß unter physiologischen Bedingungen die Beta_1 -Adrenozeptoren in wesentlich größerem Ausmaß down-reguliert sind als die Beta_2 -Adrenozeptoren (Abb.23). Diese Annahme stützt sich auf die Tatsache, daß das relativ beta_1 -selektive Noradrenalin das dominierende Plasmakatecholamin darstellt (45,138,162).

4.2.3. Betablocker-Absetzphänomen in kultivierten Herzzellen

Das Auftreten von Angina pectoris, Herzinfarkt, Tachykardie und hypertensiver Krise nach plötzlichem Absetzen einer Betablocker-Behandlung bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Hypertonie wurde als "Betablocker-Absetzphänomen" oder "Rebound-Phänomen" bezeichnet (102,130,143,144). Als Ursache dieses Phänomens wurde von den meisten Autoren eine gesteigerte Katecholamin-empfindlichkeit des Herzens genannt, die durch eine Zunahme der Zahl kardialer Beta-Adrenozeptoren erklärt werden kann (72,102,169). Diese Betablocker-Absetzstudien, die im wesentlichen mit Propranolol durchgeführt wurden, sind aber nicht unwidersprochen geblieben. Von einigen Arbeitsgruppen konnte nach Absetzen von Propranolol keine erhöhte Rezeptordichte nachgewiesen werden (40). Als mögliche andere Mechanismen des Betablocker-Entzugssyndroms wurden eine Erhöhung zirkulierender Schilddrüsenhormone, eine Thrombozytenhyperaggregabilität, eine vermehrte Plasma-Renin Freisetzung und ein erhöhter Sympathikotonus diskutiert (102,143).

In kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen konnte in der vorliegenden Studie ein Betablocker-Absetzphänomen nachgewiesen werden: Nach dreitägiger Züchtung der Herzmuskelzellen in einem serumfreien Kulturmedium, das Propranolol in einer Konzentration 90%iger Rezeptorbesetzung enthält, reagieren die Herzmuskelzellen auf Katecholamine empfindlicher. Die Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung und die Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit ist zu niedrigeren Isoproterenol-Konzentrationen verschoben, die maximale Antwort gesteigert (Abb.26,27). Diese erhöhte Beta-Adrenozeptor-Sensitivität geht mit einer Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren während der Betablockade ohne Änderung der Bindungseigenschaften einher (Abb.25).

Im Gegensatz dazu konnte mit zwei weiteren Betablockern - Timolol (minimale ISA) (196) und Pindolol (starke ISA) - kein Absetzphänomen nachgewiesen werden. Timolol verändert die Beta-Adrenozeptor-Empfindlichkeit nicht, während Pindolol sogar zu einer Desensibilisierung führt. Diese Änderungen der Beta-Adrenozeptor-Empfindlichkeit sind korreliert mit einer nach Timolol-Exposition unveränderten und nach Pindolol verminderten Rezeptorzahl (Abb.24). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß nach Absetzen einer Beta-Rezeptorenblockade nur dann ein Absetzphänomen auftritt, wenn es während der Betablockade zu einer Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren gekommen ist. Eine Verminderung der Rezeptorzahl führt dagegen zu einer abgeschwächten Katecholaminempfindlichkeit.

In Studien an Beta₂-Adrenozeptoren menschlicher Lymphozyten wurden nach Betablockade Ergebnisse berichtet, die mit den Resultaten an Hühner-Herzmuskelzellen in katecholaminfreiem Medium gut übereinstimmen. Betablocker ohne ISA führten in verschiedenen Studien zu einer Zunahme, partielle Agonisten dagegen zu einer Abnahme der Zahl lymphozytärer Beta₂-Adrenozeptoren (27,126,128). Aus diesen Experimenten wurde der Schluß gezogen, Betablocker mit ISA könnten das Auftreten eines Absetzphänomens verhindern (27,126,143).

Allerdings spiegeln beide genannten Untersuchungsmodelle die physiologische Situation nur unvollständig wider: Die Lymphozyten besitzen Beta₂-Adrenozeptoren, während am Herzen Beta₁-Adrenozeptoren überwiegen (4.2.1.).

Den Herzmuskelzellkulturen fehlt andererseits eine wichtige Komponente der Regulation kardialer Beta-Adrenozeptoren, nämlich das Vorhandensein endogener Katecholamine. Daher wurde im Folgenden der Effekt von Betablockern in einem durch Zugabe von Katecholaminen vervollständigten Zellkulturmodell untersucht.

4.2.4. Bedeutung des Noradrenalins beim Betablocker-Absetzphänomen

Die Katecholaminspiegel im menschlichen Plasma liegen im Bereich von ca. $(0,15-3,5) \times 10^{-9} \text{ M}$ Noradrenalin und $(0,01-0,8) \times 10^{-9} \text{ M}$ Adrenalin (138). Bei koronarer Herzkrankheit, Hypertonie und Herzinsuffizienz können diese Konzentrationen um den Faktor 3 (45), bei körperlicher Belastung bis um den Faktor 10 gesteigert sein (162). Die endogenen Katecholamine führen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu einer konzentrationsabhängigen Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren mit konsekutiver Subsensitivität des Adenylatzyklase-Systems (24,25,68).

Durch Zugabe von Noradrenalin zum serumfreien Züchtungsmedium wird in dem in vitro-Modell kultivierter Herzzellen versucht, den basalen Zustand der Rezeptor-Densensibilisierung durch endogene Katecholamine nachzuahmen. Da die Rezeptoraffinitäten am menschlichen Herzen und in kultivierten Hühner-Herzzellen ähnlich sind (18,24,25,26,120,145,201), wurde dem Inkubationsmedium Noradrenalin in vergleichbaren Konzentrationen zugegeben. Im Konzentrationsbereich physiologischer Noradrenalinspiegel liegen die Beta-Adrenozeptoren gegenüber den Beta-Adrenozeptoren der Kontrollzellen um ca. 20-50% down-reguliert vor (Abb.20). In diesem physiologischeren Zellkulturmodell wurden die Effekte der Betablocker Propranolol und Pindolol gemessen (Abb.28): In Abwesenheit von Noradrenalin im Medium führt Propranolol zur Zunahme, Pindolol dagegen zur Abnahme der Rezeptorzahl, wie auch in Studien an lymphozytären Beta₂-Adrenozeptoren berichtet worden ist (27,126,128). Propranolol (keine ISA) steigert auch in Anwesenheit unterschiedlicher (-)Noradrenalin-Konzentrationen immer die Zahl der Beta-Adrenozeptoren, da es die Bindung von Noradrenalin an den Rezeptor verhindert und damit die Noradrenalin-induzierte Rezeptor-Down-Regulation blockiert (Abb.28).

Die Wirkungen des partiellen Agonisten Pindolol lassen dagegen die beiden Wirkungskomponenten der Betablocker mit ISA erkennen: Im Noradrenalin-freien System vermindert Pindolol durch seine intrinsische Aktivität die Rezeptorzahl. Je mehr die Beta-Adrenozeptoren durch Noradrenalin jedoch bereits down-reguliert vorliegen, desto mehr tritt die intrinsische Komponente in den Hintergrund und die betablockierende Aktivität überwiegt. Im Bereich hoher Noradrenalin-Konzentrationen ($10^{-7}M$) führt Pindolol schließlich zu einer nahezu identischen Rezeptor Up-Regulation wie Propranolol, da es als reiner Betablocker fungiert. Die intrinsische sympathomimetische Aktivität von Beta- Rezeptorenblockern wirkt sich also nur bei geringer bzw. fehlender Stimulation und Down-Regulation der Rezeptoren durch endogene Katecholamine aus. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der Zugabe von Noradrenalin zum Züchtungsmedium bei der Untersuchung der Beta₁-Adrenozeptor-Regulation in Herzmuskelzellkulturen.

Bei Untersuchungen an lymphozytären Beta₂-Adrenozeptoren als Modell des Herzens muß in Betracht gezogen werden, daß die Beta₂-Adrenozeptoren durch das relativ beta₁-selektive Noradrenalin in weitaus geringerem Maße down-reguliert sind als die Beta₁-Adrenozeptoren (Abb.23). Dies erklärt, warum bei der Untersuchung des Betablocker-Absetzphänomens die Studien an lymphozytären Beta₂-Adrenozeptoren mit den Ergebnissen an Herzmuskelzellen im "artifiziellen", Noradrenalin-freien, Inkubationsmedium übereinstimmen, während sie den Resultaten im "physiologischen", durch Noradrenalin ergänzten, Zellkultursystem widersprechen.

Eine Zunahme der Zahl kardialer Beta-Adrenozeptoren, die Grundlage des Betablocker-Absetzphänomens, muß also auch bei Behandlung mit Betablockern mit ISA in Erwägung gezogen werden. Dies bestätigen auch klinische Berichte, in denen Absetzphänomene auch nach Entzug von Betablockern mit ISA beobachtet wurden (144,149,170,199). Eine ausgeprägte Up-Regulation der Beta-Adrenozeptoren durch eine Betablockade ist insbesondere bei Zuständen erhöhter Katecholaminspiegel zu erwarten (Abb.28).

Ein überraschender Befund im Hinblick auf die Regulation der Beta-Adrenozeptoren

durch Betablocker in kultivierten Herzmuskelzellen bedarf noch der Erwähnung: Bereits im serumfreien Inkubationsmedium - ohne Zugabe von Noradrenalin - führt Propranolol zur Zunahme der Rezeptorzahl (Abb.24,25). Möglicherweise sind in Hühner-Herzmuskelzellen entgegen Berichten anderer Autoren (161) geringe Mengen neuronal oder extraneuronal gespeicherter Katecholamine vorhanden, die auch im "Noradrenalin-freien", serumfreien Kulturmedium zu einer basalen Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren führen, eine Hypothese, die noch der experimentellen Prüfung bedarf.

4.2.5. Beta₂- "Pseudo-Selektivität" der ISA

Die intrinsische sympathomimetische Aktivität nicht-selektiver Betablocker manifestiert sich hauptsächlich am Beta₂-Adrenozeptor (1,37,177). So berichtete Abrahamsson (1), daß die Beta-Adrenozeptor-Stimulation durch die partiellen Agonisten Alprenolol, Oxprenolol und Pindolol in Ratten an Beta₂-Adrenozeptoren des Uterus wesentlich stärker ausgeprägt war als an Beta₁-Adrenozeptoren des rechten Vorhofs des Herzens. Clark (37) zeigte auf, daß in verschiedenen Tierspezies die relaxierenden Wirkungen von Pindolol an den Beta₂-Adrenozeptoren des Uterus und der glatten Gefäßmuskulatur annähernd denjenigen eines vollständigen Agonisten entsprachen, während die stimulatorische Wirkung von Pindolol an kardialen Beta₁-Adrenozeptoren zu vernachlässigen war. Diese Befunde führten zu der Hypothese, daß partielle Agonisten ihre betablockierende Wirkung in gleicher Weise an Beta₁- und Beta₂-Adrenozeptoren entfalten, während die stimulatorische Wirkung in erster Linie auf die Beta₂-Adrenozeptoren beschränkt ist.

In Hühner-Herzzellen liegen bei einer Noradrenalin-Konzentration von 10^{-8} M im Züchtungsmedium die Beta₁-Adrenozeptoren bereits zu etwa 50% down-reguliert vor, während die Zahl der Beta₂-Adrenozeptoren durch das relativ beta₁-selektive Noradrenalin nicht vermindert ist (Abb.23). Der partielle Agonist Pindolol wirkt unter diesen Bedingungen gegensinnig auf die Rezeptor-Subtypen (Abb.29): Die Zahl der Beta₁-Adrenozeptoren nimmt zu, da

durch die betablockierende Komponente des Pindolol die Noradrenalin-induzierte Down-Regulation blockiert wird. An den nicht down-regulierten Beta_2 -Adrenozeptoren führt Pindolol dagegen durch seine schwache agonistische Komponente, die intrinsische sympathomimetische Aktivität, zur Abnahme der Rezeptorzahl.

Da somit die ISA nur an nicht oder nur wenig down-regulierten Rezeptoren zum Tragen kommen kann (4.2.4.), wirkt sie sich bei physiologischen Noradrenalin-Konzentrationen hauptsächlich am Beta_2 -Adrenozeptor aus (Abb.29). Ist dagegen im Zellkulturmodell bei fehlender stimulatorischer oder - andererseits - übermäßig starker Stimulation des Adrenozeptor/Adenylatzyklase-Systems durch Noradrenalin der physiologischerweise unterschiedliche Grad der Beta-Adrenozeptor-Down-Regulation nicht vorhanden, so kommt die ISA an Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren in gleicher Weise zur Wirkung (Abb.29). Die Ergebnisse an Herzzellkulturen demonstrieren somit eindeutig die nur scheinbare Selektivität der intrinsischen Komponente von Betablockern. Die Beta_2 - "Pseudo-Selektivität" der intrinsischen sympathomimetischen Aktivität kommt somit nicht durch eine höhere Affinität der Betablocker zum Beta_2 -Adrenozeptor, sondern durch den unterschiedlichen Grad der Beta-Adrenozeptor-Down-Regulation durch das relativ beta_1 -selektive Noradrenalin zustande.

4.2.6. Klinische Schlußfolgerungen

Entgegen den Ergebnissen an lymphozytären Beta_2 -Adrenozeptoren lassen die Resultate an kultivierten Hühner-Herzzellen die Schlußfolgerung zu, daß Absetzphänomene nach plötzlichem Entzug von Betablockern auch durch Absetzen von Betablocker mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität hervorgerufen werden können (Abb.28). Allerdings sollten nach Absetzen von partiellen Agonisten nur Absetzphänomene auftreten, die über Beta_1 -Adrenozeptoren vermittelt werden, während die Katecholaminempfindlichkeit an Beta_2 -Adrenozeptoren abgeschwächt sein sollte.

Diese experimentellen Ergebnisse stehen mit den Resultaten klinischer Studien in

guter Übereinstimmung (23,78,144,149,153,170). Durch folgende zwei Tests wird versucht, die Ansprechbarkeit beta-adrenerger Rezeptoren an Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren getrennt zu untersuchen: Die Steigerung der Herzfrequenz durch körperliche Belastung wird als Test für die Beta_1 -Adrenoceptor-Empfindlichkeit angesehen, da hier die durch Sympathikusaktivierung hervorgerufene neuronale Noradrenalinfreisetzung im Vordergrund stehen soll (144). Der Herzfrequenzanstieg durch Infusion von Isoproterenol soll dagegen die Beta_2 -Sensitivität widerspiegeln, weil die chronotrope Wirkung hier im wesentlich als Reflextachykardie betrachtet wird, die durch Beta_2 -Adrenoceptor-vermittelte Vasodilatation entstehen soll (144). Nach Absetzen von Propranolol wurde eine gesteigerte Katecholaminempfindlichkeit in beiden Tests gemessen (23,78,144,149). Nach Behandlung mit dem partiellen Agonisten Pindolol dagegen trat eine Hypersensitivität nur im Beta_1 -Belastungstest auf, während im Beta_2 -Test die Antwort auf die Isoproterenol-Infusion abgeschwächt war (144,153,170). Aus diesen Untersuchungen wurde der Schluß gezogen, daß nach Absetzen von Betablockern ohne ISA eine gesteigerte Empfindlichkeit an Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren in Erwägung gezogen werden muß, während nach Entzug von partiellen Agonisten nur mit Beta_1 -vermittelten Absetzphänomenen, z.B. einem Anstieg der Herzfrequenz bei körperlicher Belastung, gerechnet werden muß (Abb.29).

Die Erklärung für diese unterschiedliche Wirkung partieller Agonisten ist die beta_2 - "pseudo-selektive" Wirkung der intrinsischen sympathomimetischen Aktivität. Da in Gegenwart physiologischer Katecholaminspiegel die Beta_1 -Adrenozeptoren in wesentlich größerem Ausmaß down-reguliert vorliegen, wirkt sich die intrinsische Komponente partieller Agonisten hauptsächlich am Beta_2 -Adrenoceptor aus.

Die Beta_2 -Pseudo-Selektivität" der ISA hat aber nicht nur für das Betablocker-Absetzphänomen Bedeutung. Sie kann auch unterschiedliche Effekte partieller Agonisten an Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren unter Betablockade erklären: Bei der Behandlung belastungsinduzierter Tachykardien

(β_1) unterscheiden sich Betablocker mit und ohne ISA nicht wesentlich (70). Dagegen haben sich bei der Vermeidung von respiratorischen Nebenwirkungen, von Hypoglykämien oder von Komplikationen bei arterieller Verschlusskrankheit (β_2) partielle Agonisten gegenüber Betablockern ohne ISA als überlegen erwiesen (70). Die experimentell erwiesene β_2 - "Pseudo-Selektivität" der ISA stellt eine Begründung für das Überwiegen der ISA am β_2 -Adrenozeptor dar.

4.3. Toleranzmechanismen in kultivierten Herzzellen

4.3.1. Rezeptorregulation als Prinzip der Toleranzentwicklung

In der vorliegenden Arbeit wurden Toleranzmechanismen am Herzglykosid-Rezeptor und am Beta-Adrenozeptor kultivierter Hühner-Herzzellen beschrieben. Die Regulation der Rezeptorzahl ohne Änderung der Bindungseigenschaften stellt dabei das Prinzip der Toleranzentwicklung dar. Je nach der dem Rezeptor nachgeschalteten Reaktionskette führt eine Zu- oder Abnahme der Rezeptorzahl zur Wirkungsabschwächung des betreffenden Pharmakons und damit zur Toleranz. Während die Herzglykosid-Toleranz durch eine Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren vermittelt wird, entsteht die Toleranzentwicklung bei Gabe von Beta-Adrenozeptor-Agonisten durch eine Abnahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren. Die Ursache des Betablocker-Absetzphänomens stellt eine Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren während der Betablocker-Therapie dar. Eine Betablocker-Toleranz unter Betablockade tritt dagegen nicht auf, da in Gegenwart therapeutischer Dosierungen der Betablocker sowohl bei normaler als auch bei erhöhter Beta-Adrenozeptorenzahl nahezu alle Rezeptoren besetzt sind. Die Regulationsvorgänge kardialer Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren stellen Adaptationsvorgänge der Herzmuskelzelle dar, deren Funktion es ist, die durch einen "Störfaktor" beeinträchtigte Zell-Homöostase wiederherzustellen. Den Trigger zur Auslösung der Regulationsphänomene stellt dabei im ersten Fall die "störende" Erhöhung der intrazellulären Natriumionenkonzentration (96), im zweiten Fall die "störende" Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration dar (19,157,169). Da die Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren bzw. Beta-Adrenozeptoren einen Zeitraum von 24-48 Stunden in Anspruch nimmt und durch den Proteinsynthesehemmer Cycloheximid verhindert werden kann, handelt es sich dabei wahrscheinlich um eine Zunahme der Syntheserate dieser Moleküle (121,191-193). Bei der in Minuten bis wenigen Stunden (18,91,113,118) ablaufenden Beta-Adrenozeptor-Desensibilisierung sind dagegen aufgrund der in der Literatur beschriebenen Befunde andere Regulationsschritte (Rezeptorphosphorylierung, -Affinitätsänderung, -Internalisierung) beteiligt (19,121,134,157,169). Da

intrazelluläres Na^+ und cAMP unabhängig voneinander reguliert werden, ändert sich bei der Herzglykosid-Toleranz die Zahl der Beta-Adrenozeptoren nicht (3.1.4.).

Von diesen spezifischen Adaptationsmechanismen der Herzmuskelzelle bei der Pharmakontoleranz müssen aber Änderungen der Rezeptorzahl unterschieden werden, die durch Hormonwirkung auf die Zellen hervorgerufen werden können. So führt Trijodthyronin in kultivierten Herzmuskelzellen sowohl zu einer Zunahme der Herzglykosid-Rezeptoren (97,194) als auch der Beta-Adrenozeptoren (113). Da diese Rezeptoren "pharmakologisch genutzt" werden, kommt es dadurch zu einer Abschwächung der Herzglykosidempfindlichkeit bzw. Überempfindlichkeit gegenüber Beta-Adrenozeptor-Agonisten. Bei der Hyperthyreose kommt aber dem intrazellulären Na^+ bzw. cAMP keine Bedeutung als Trigger zur Auslösung der Rezeptor-regulation zu (97,113). Eine Änderung der Rezeptorzahl hat also unabhängig von ihrer Ursache für die an diesen Rezeptoren angreifenden Pharmaka bzw. Hormone die gleiche Wirkung, nämlich Überempfindlichkeit oder Toleranzentwicklung.

4.3.2. Möglichkeiten therapeutischen Eingreifens zur Verhinderung einer Toleranzentwicklung

Aus den Untersuchungen am Herzglykosid-Rezeptor und am Beta-Adrenozeptor kultivierter Hühner-Herzmuskelzellen lassen sich Möglichkeiten therapeutischen Eingreifens zur Verhinderung einer Herzglykosid-Toleranz und eines Betablocker-Absetzphänomens ableiten. Bisherige Befunde sprechen dafür, daß diese Zellkulturergebnisse auf die Behandlung von Patienten übertragbar sind (ausführliche Darstellung in 194):

1. Die Frage der Toleranzentwicklung hat bei der Behandlung mit Herzglykosiden, die häufig über Jahre und Jahrzehnte verordnet werden, eine besondere Bedeutung. Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei einer mittleren therapeutischen Dosierung ohne Auftreten kardialer Nebenwirkungen mit dem Auftreten einer grundsätzlich möglichen Toleranzentwicklung nicht zu rechnen ist. Die Entstehung einer Toleranz bei toxischer Dosierung sollte andererseits davon abhalten, eine therapeutische Herzglykosidwirkung mit sehr hohen Dosen erzwingen zu wollen.

2. Durch Verwendung von Betablockern mit ISA hoffte man, das Auftreten eines Betablocker-Absetzphänomens verhindern zu können (27,128,143). In der vorliegenden Studie wird aber demonstriert, daß Betablocker mit ISA nur Absetzphänomene an Beta_2 -, nicht aber an Beta_1 -Adrenozeptoren verhindern können. Aus der Tatsache, daß die kardialen Beta_1 -Adrenozeptoren für das Betablocker-Absetzphänomen die entscheidende Bedeutung besitzen (102), kann gefolgert werden, daß die Verwendung von Betablockern mit ISA zur Vermeidung eines Betablocker-Absetzphänomens kein geeignetes Mittel darstellt.

Wenn bei einem Patienten mit fortgeschrittener koronarer Herzkrankheit ein Betablocker abgesetzt werden muß, so sollte sowohl im Falle eines Betablockers mit als auch ohne ISA ein ausschleichendes Dosierungsschema unter engmaschiger Überwachung und körperlicher Schonung gewählt werden (102,143).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In kultivierten Herzzellen von Hühnerembryonen wurden die Mechanismen der Pharmakontoleranz an Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren untersucht.

1. Herzglykosid-Toleranz in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

1.1. Hühner-Herzmuskelzellen besitzen eine einheitliche Klasse von Herzglykosid-Rezeptoren (ca. 750.000/Zelle). Die Besetzung dieses Rezeptors mit g-Strophanthin führt zur Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes und zur positiv inotropen Wirkung. Allerdings kommt es erst bei einer Besetzung von mehr als 50% der Rezeptoren zu einer meßbaren Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes, während eine positiv inotrope Wirkung bereits bei g-Strophanthin-Konzentrationen nachgewiesen werden kann, bei denen 20-40% der Rezeptoren besetzt sind. Toxische Herzglykosid-Effekte (Arrhythmien) treten bei einer Rezeptorbesetzung von mehr als 60% auf.

1.2. Die Züchtung der Herzmuskelzellen in strophanthinhaltigem Medium führt zur Abschwächung sowohl der positiv inotropen als auch der toxischen Strophanthinwirkung. Ursache dieser Toleranzentwicklung ist eine Zunahme der Zahl der (Na^+/K^+) -ATPase-Moleküle pro Herzmuskelzelle ohne Änderung der Bindungseigenschaften des Herzglykosid-Rezeptors. Diese Toleranzentwicklung tritt innerhalb von 2 Tagen ein und ist nach Entfernen des Strophanthins aus dem Kulturmedium in der gleichen Zeitspanne reversibel.

1.3. Zum Auftreten einer Herzglykosid-Toleranz kommt es nur bei toxischen Strophanthin-Konzentrationen, nicht aber in Gegenwart positiv inotrop wirksamer Strophanthin-Konzentrationen, die keine Arrhythmien hervorrufen. Die Toleranzentwicklung ist als Anpassungsreaktion der Herzmuskelzelle aufzufassen, eine höhergradige, Herzglykosid-induzierte Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes zu kompensieren.

1.4. Diese Befunde zeigen, daß bei der Langzeitmedikation mit Herzglykosiden bei sehr hoher Dosierung prinzipiell eine Toleranzentwicklung auftreten kann. Bei einer mittleren therapeutischen Dosierung ohne Auftreten kardialer Nebenwirkungen (Arrhythmien) ist aber mit einer Herzglykosid-Toleranz nicht zu rechnen.

2. Das Betablocker-Absetzphänomen in kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen

2.1. Kultivierte Herzmuskelzellen besitzen eine einheitliche Klasse von Beta_1 -Adrenozeptoren (ca. 5000/Zelle), während die Beta-Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen Beta_2 -Adrenozeptoren (ca. 3000/Zelle) sind. Die Bindung des Beta-Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol führt in den Herzmuskelzellen zur Bildung von zyklischem AMP und zur positiv inotropen Wirkung.

Die physiologischerweise vorhandene Verminderung (Down-Regulation) der Beta-Adrenozeptoren durch endogene Katecholamine wurde durch Zugabe von Noradrenalin zum serumfreien Züchtungsmedium nachgeahmt. Die Beta_1 -Adrenozeptoren der Herzmuskelzellen liegen bereits bei erheblich niedrigeren Noradrenalin-Konzentrationen down-reguliert vor als die Beta_2 -Adrenozeptoren der Herzbindegewebszellen.

2.2. Züchtung der Herzmuskelzellen in Gegenwart des Beta-Rezeptorenblockers Propranolol (keine ISA) führt nach Absetzen des Betablockers zu einer Steigerung sowohl der Isoproterenol-induzierten cAMP-Bildung als auch der positiv inotropen Wirkung in den Zellen. Ursache dieses Betablocker-Absetzphänomens ist eine Zunahme der Zahl der Beta-Adrenozeptoren während der Betablockade.

Zu einem Propranolol-Absetzphänomen kommt es bei jedem Grad der Down-Regulation der Beta-Adrenozeptoren. Dagegen führt Pindolol (starke ISA) nur bei höhergradiger Beta-Adrenozeptor-Down-Regulation zum Absetzphänomen.

2.3. In Gegenwart physiologischer Noradrenalin-Konzentrationen werden Beta_1 - und Beta_2 -Adrenozeptoren durch Pindolol in gegensinniger Weise reguliert: die

Zahl der Beta_1 -Adrenozeptoren steigt an, die Zahl der Beta_2 -Adrenozeptoren nimmt ab. Dieser Befund zeigt, daß die intrinsische sympathomimetische Aktivität nicht-selektiver Betablocker nur dann zum Tragen kommt, wenn die Beta-Adrenozeptoren nicht höhergradig down-reguliert vorliegen. Da die Beta_2 -Adrenozeptoren in wesentlich geringerem Ausmaß down-reguliert sind als die Beta_1 -Adrenozeptoren, wirkt sich die intrinsische sympathomimetische Aktivität nicht-selektiver Betablocker hauptsächlich am Beta_2 -Adrenozeptor-Subtyp aus. Diese Beta_2 - "Pseudo-Selektivität" der ISA kommt durch den unterschiedlichen Grad der Beta-Adrenozeptor-Down-Regulation der Rezeptor-Subtypen durch das vorherrschende Plasmakatecholamin Noradrenalin zustande.

2.4. Aus diesen Untersuchungen an Beta-Adrenozeptoren können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden: Nicht nur Betablocker ohne ISA, sondern auch Betablocker mit ISA können zum Betablocker-Absetzphänomen führen. Allerdings sollten nach Absetzen von Betablockern mit ISA nur Absetzphänomene auftreten, die über Beta_1 -Adrenozeptoren vermittelt werden, während die Katecholaminempfindlichkeit an Beta_2 -Adrenozeptoren abgeschwächt sein sollte. Die Tatsache, daß die intrinsische sympathomimetische Aktivität von Betablockern sich hauptsächlich am Beta_2 -Adrenozeptor manifestiert, kann durch die experimentell erwiesene Beta_2 - "Pseudo-Selektivität" der ISA erklärt werden.

3. Aus den experimentellen Ergebnissen an Herzglykosid-Rezeptoren und Beta-Adrenozeptoren kultivierter Hühner-Herzzellen läßt sich ableiten, daß die Regulation der Rezeptorzahl ohne Änderung der Bindungseigenschaften ein wesentliches Prinzip der Toleranzentwicklung herzwirksamer Pharmaka darstellt. Die Zunahme der Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren bei der Herzglykosid-Toleranz bzw. der Beta-Adrenozeptoren beim Betablocker-Absetzphänomen dürfte einen durch die intrazelluläre Natriumionenkonzentration bzw. das intrazelluläre cAMP getriggerten Prozeß der Rezeptorneusynthese darstellen (96,157).

Die Untersuchungen zur Toleranzentwicklung herzwirksamer Pharmaka auf zellulärer Ebene lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- a) Die Entwicklung einer Herzglykosid-Toleranz läßt sich durch Verwendung einer nebenwirkungsfreien, mittleren therapeutischen Dosierung vermeiden.
- b) Das Auftreten eines Betablocker-Absetzphänomens kann durch die Verwendung von Betablockern mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität nicht verhindert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAHAMSSON, T.: The β_1 - and β_2 -adrenoceptor stimulatory effects of alprenolol, oxprenolol and pindolol: a study in the isolated right atrium and uterus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 87 , 657-664 (1986)
2. AITON, J.F., LAMB, J.F., OGDEN, P.: Down-regulation of the sodium pump following chronic exposure of HeLa cells and chick embryo heart cells to ouabain. *Br. J. Pharmacol.* 73 , 333-340 (1981)
3. AKERA, T.: Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor? *Science* 198 , 569-574 (1977)
4. AKERA, T., BRODY, T.M.: The role of Na^+, K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 29 , 187-220 (1978)
5. AKERA, T.: Effects of cardiac glycosides on Na^+, K^+ -ATPase. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/I Cardiac Glycosides. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 287-327 (1981)
6. ALDERMAN, E.L., COLTARD, J., WETTACH, G.E., HARRISON, D.C.: Coronary artery syndromes after sudden propranolol withdrawal. *Ann. Intern. Med.* 81 , 625-627 (1974)
7. ALLQUANDER, C.: Dependence on sedative and hypnotic drugs. *Acta Psychiatr. Scand. (Suppl.)*, 270 , 1-120 (1978)
8. ANASTASIA, J.V., MCCARL, R.L.: Effects of cortisol on cultured rat heart cells. Lipase activity, fatty acid oxidation, glycogen metabolism, and ATP levels as related to the beating phenomenon. *J. Cell. Biol.* 57 , 109-116 (1973)
9. ARNOLD, S.B., BYRD, R., MEISTER, W., MELMON, K., CHEITLIN, M.D., BRISTOW, D., PARMLEY, W.W., CHATTERJEE, K.: Long-term digitalis therapy improves left ventricular function in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 303 , 1443-1448 (1980)
10. BARRY, W.H., BIEDERT, S., MIURA, D.S., SMITH, T.W.: Changes in cellular Na^+ , K^+ and Ca^{2+} contents, monovalent cation transport rate and contractile state during washout of cardiac glycosides from cultured chick heart cells. *Circ. Res.* 49 , 141-149 (1981)
11. BAUMANN, G., PERMANETTER, B., WIRTZFELD, A.: Possible value of H_2 -receptor agonists for treatment of catecholamine-insensitive congestive heart failure. *Pharmac. Ther.* 24 , 265 (1984)
12. BAURIEDEL, G.: Myokardiale Wirkungen des Spurenelementes Vanadium. Untersuchungen an kultivierten Herzzellen. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1983)
13. BECKER, C., PORZIG, H.: Recovery of β -adrenoceptors and cyclic AMP response after long term treatment of intact heart cells with β -blockers. *Br. J. Pharmacol.* 82 , 745-755 (1984)
14. BIEDERT, S., BARRY, W.H., SMITH, T.W.: Inotropic effects and changes in sodium and calcium contents associated with inhibition of monovalent cation active transport by ouabain in cultured myocardial cells. *J. Gen. Physiol.* 74 , 479-494 (1979)

15. BLONDEL, B., ROIJEN, I., CHENEVAL, J.P.: Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27, 356-358 (1971)
16. BLUSCHKE, V., BONN, R., GREEFF, K.: Increase in the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity in heart muscle after chronic treatment with digitoxin or potassium deficient diet. *Europ. J. Pharmacol.* 37, 189-191 (1976)
17. BOARDMAN, L.J., LAMB, J.F., McCALL, D.: Uptake of (^3H)ouabain and Na pump turnover rates in cells cultured in ouabain. *J. Physiol.* 225, 619-635 (1972)
18. BOBIK, A., CAMPBELL, J.H., CAMPBELL, G.R.: Mechanism of isoprenaline induced refractoriness of the β -adrenoceptor-adenylate cyclase system in chick embryo cardiac cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 3, 541-553 (1981)
19. BOBIK, A., LITTLE, P.J.: Role of cyclic AMP in cardiac β -adrenoceptor desensitization: Studies using prenalterol and inhibitors of phosphodiesterase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6, 795-801 (1984)
20. BOLTE, H.D., SCHREY, A.: Beta-Rezeptorenblocker. Hrsg.: H.D. Bolte, A. Schrey. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1981)
21. BONN, R., GREEFF, K.: The effect of chronic administration of digitoxin on the activity of the myocardial ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in guinea-pigs. *Arch. int. Pharmacodyn.* 233, 53-64 (1978)
22. BOSSALLER, C., SCHÖBER, O.: Increased number of red cell ouabain binding sites in diseases with chronic potassium depletion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 319, R43 (1982)
23. BOUDOULAS, H., LEWIS, R.P., KATES, R.E., DALAMANGAS, G.: Hypersensitivity to adrenergic stimulation after propranolol withdrawal in normal subjects. *Ann. Int. Med.* 87, 433-436 (1977)
24. BRISTOW, M.R., GINSBURG, R., MINOBE, W., CUBICCIOTTI, R.S., SAGEMAN, W.S., LURIE, K., BILLINGHAM, M.E., HARRISON, D.C., STINSON, E.B.: Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.* 307, 205-211 (1982)
25. BRISTOW, M.R., KANTROWITZ, N.E., GINSBURG, R., FOWLER, M.B.: β -adrenergic function in heart muscle disease and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, (Suppl. 2), 41-52 (1985)
26. BRODDE, O.E., KARAD, K., ZERKOWSKI, H.R., ROHM, N., REIDEMEISTER, J.C.: Coexistence of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in human right atrium. *Circ. Res.* 53, 752-758 (1983)
27. BRODDE, O.E., DAUL, A., STUKA, N., O'HARA, N., BORCHARD, U.: Effects of β -adrenoceptor antagonist administration on β_2 -adrenoceptor density in human lymphocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328, 417-422 (1985)
28. BRODDE, O.E., KRETSCH, R., IKEZONO, K., ZERKOWSKI, H.R., REIDEMEISTER, J.C.: Human β -adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte β -adrenoceptor density. *Science* 231, 1584-1585 (1986)
29. BROWN, L., LORENZ, B., ERDMANN, E.: Reduced positive inotropic effects in diseased human ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* 20, 516-520 (1986)

30. BROWN, L., WAGNER, G., HUG, E., ERDMANN.: Oubain binding and inotropy in acute potassium depletion in guinea pigs. *Cardiovasc. Res.* 20 , 286-293 (1986)
31. BROWN, L., WERDAN, K., ERDMANN, E.: The red blood cell. A model for oubain receptor regulation in the heart? *Klin.Wochenschr.* 64 , 786-792 (1986)
32. BUXTON, I.L.O., BRUNTON, L.L.: Direct analysis of β -adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat. *Circ. Res.* 56 , 126-132 (1985)
33. CALDWELL, J., SEVER, P.S.: The biochemical pharmacology of abused drugs. II. Alcohol and barbiturates. *Clin. Pharm. Ther.* 16 , 737-749 (1974)
34. CAMERON, I.R., HALL, R.J.C.: The effect of dietary K^+ concentration and pH of cardiac and skeletal muscle in rabbits. *J. Physiol.* 251 , 70P-71P (1975)
35. CAMERON, I.R., WARD, J.P.T.: Adaption of the sodium pump to chronic potassium lack. *J. Physiol.* 316 , 8P (1981)
36. CHENG, Y.C., PRUSOFF, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22 , 3099-3108 (1973)
37. CLARK, B.J.: Pharmacological analysis of the intrinsic sympathomimetic activity of pindolol: Evidence for selective β_2 -adrenoceptor stimulation. *Triangle* 23 , 33-41 (1984)
38. CLAYCOMB, W.C.: Culture of cardiac muscle cells in serum-free media. *Exp. Cell. Res.* 131 , 231-236 (1980)
39. CRAMB, G., GRIFFITHS, N.M., AITON, J.F., SIMMONS, N.L.: Biochemical and physiological adaptation to chronic propranolol treatment in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 33 , 1969-1976 (1984)
40. CROFT, C.H.: Abrupt withdrawal of β -blockade therapy in patients with myocardial infarction - effects on infarct size, left ventricular function, and hospital course. *Circ.* 73 , 1281-1290 (1986)
41. CUMBERBATCH, M., ZAREIAN, K., DAVIDSON, C., MORGAN, D.B., SWAMINATHAN, R.: The early and late effects of digoxin treatment on the sodium transport, sodium content and (Na^+K^+) -ATPase of erythrocytes. *Br. J. Clin. Pharmac.* 11 , 565-570 (1981)
42. DAVIDSON, C., GIBSON, D.: Clinical significance of positive inotropic action of digoxin in patients with left ventricular disease. *Br. Heart J.* 35 , 970-976 (1973)
43. DIAZ, R.G., SOMBERG, J., FREEMAN, E., LEVITT, B.: Myocardial infarction after propranolol withdrawal. *Amer. Heart J.* 88 , 257-258 (1974)
44. DOBES, S.M., KENYON, W.I., DOBBS, R.J.: Maintenance digoxin after an episode of heart failure: placebo-controlled trial in outpatients. *Br. Med. J.* 1 , 749-752 (1977)
45. DOMINIAK, P., DELIUS, W., GROBECKER, H.: Changes in plasma catecholamine concentrations in patients with coronary heart disease during pacing and physical exercise. *Clin. Cardiol.* 8 , 77-81 (1985)

46. DOW, J.W., HARDIN, N.G.L., POWELL, T.: "Isolated cardiac myocytes" I. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue, 483-514; II. Functional aspects of mature cells, 549-579. *Cardiovas. Res.* 15 (1981)
47. DURETT, L.R., MATHEW, B.R., NECHAY, B.R., NELDON, S.L., WILLIAMS, J.F.: Relationship of cardiac muscle tension to Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase activity after chronic digitoxin administration in cats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, 411-416 (1984)
48. ERDMANN, E., BOLTE, H.D., LÜDERITZ, B.: The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 121-125 (1971)
49. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 386-398 (1973)
50. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 302-315 (1973)
51. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. III. On the stability of the ouabain receptor against physical treatment, hydrolases and SH reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 316-324 (1973)
52. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 283, 335-356 (1974)
53. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W.: Increased number of ouabain binding sites in human erythrocyte membranes in chronic hypokalaemia. *Acta biol. med. germ.* 36, 879-883 (1977)
54. ERDMANN, E.: Influence of cardiac glycosides on their receptor. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/I Cardiac Glycosides. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 337-380 (1981)
55. ERDMANN, E.: Neue Aspekte der Digitalistherapie. *Internist* 24, 422-428 (1983)
56. ERDMANN, E.: Therapie mit Herzglykosiden. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo (1983)
57. ERDMANN, E., BROWN, L.: The cardiac glycoside-receptor system in the human heart. *Europ. Heart J.* 4 (Suppl. A), 61-65 (1983)
58. ERDMANN, E.: Therapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz mit Herzglykosiden. In: *Handbuch der inneren Medizin*, Band IX/4: Herzinsuffizienz. Hrsg.: G. Riecker, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 563-655 (1984)
59. ERDMANN, E.: Stellenwert der Herzglykoside bei der chronischen Herzinsuffizienz. *Klin. Wochenschr.* 62, 507-511 (1984)

60. ERDMANN, E., WERDAN, W., BROWN, L.: Neue Befunde zum Wirkungsmechanismus der Herzglykoside. In: Herzinsuffizienz. Pathophysiologie, Klinik und Therapie. Hrsg.: J. Keul und H.H. Dickhuth, Perimed Verlag, Erlangen (1984)
61. ERDMANN, E., WERDAN, K., KRAWIETZ, W.: Influence of digitalis and diuretics on ouabain binding sites on human erythrocytes. *Klin. Wochenschr.* 62, 87-92 (1984)
62. ERDMANN, E.: Therapie der chronischen Herzinsuffizienz mit positiv inotropen Pharmaka. *Internist* 27, 298-305 (1986)
63. ERLEMEIER, H.H., KUPPER, W., HAMM, C.W., BLEIFELD, W.: Toleranzentwicklung während einwöchiger Dobutamin-Behandlung. *Dtsch.Med.Wschr.* 111, 1010-1016 (1986)
64. ERTEL, R.J., CLARKE, D.E., CHAO, J.C., FRANKE, F.R.: Autonomic receptor mechanisms in embryonic chick myocardial cell cultures. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 178, 73-80 (1971)
65. FLEG, J.L., GOTTLIEB, S.H., LAKATTA, E.G.: Is digoxin really important in treatment of compensated heart failure? A placebo-controlled crossover study in patients with sinus rhythm. *Am. J. Med.* 73, 244-250 (1982)
66. FORD, A.R., ARONSON, J.K., GRAHAME-SMITH, D.G., CARVER, J.G.: Changes in cardiac glycoside receptor sites, ⁸⁶ rubidium uptake and intracellular sodium concentrations in the erythrocytes of patients receiving digoxin during the early phases of treatment of cardiac failure in regular rhythm and atrial fibrillation. *Br. J. Clin. Pharmac.* 8, 125-134 (1979)
67. FORD, A.R., ARONSON, J.K., GRAHAME-SMITH, D.G., CARVER, J.G.: The acute changes seen in cardiac glycoside receptor sites, ⁸⁶ rubidium uptake and intracellular sodium concentrations in the erythrocytes of patients during the early phases of digoxin therapy are not found during chronic digoxin therapy. *Br. J. Clin. Pharmac.* 8, 135-142 (1979)
68. FRASER, J., NADEAU, J., ROBERTSON, D., WOOD, A.J.: Regulation of human leukocyte beta receptors by endogenous catecholamines. *J. Clin. Invest.* 67, 1777-1784 (1981)
69. FRIEDMAN, J., SCHWALB, H., HALLAQ, H., PINSON, A., HELLER, M.: Interactions of cardiac glycosides with cultured cardiac cells. II. Biochemical and electron microscopic studies on the effects of ouabain on muscle and non-muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 598, 272-284 (1980)
70. FRISHMAN, W.H., CHARLAP, S., KOSTIS, J.B.: Clinical significance of intrinsic sympathomimetic activity in beta-adrenoceptor blocking drugs. In: Beta-Blockers in the Treatment of Cardiovascular Disease. Hrsg.: J.B. Kostis, E.A. DeFelice, Raven Press, New York, 253-274 (1984)
71. GALANT, S.P., DURISETI, L., UNDERWOOD, S., INSEL, P.A.: Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphonuclear leucocytes after adrenergic therapy. *N. Engl. J. Med.* 299, 933-936 (1978)
72. GLAUBINGER, G., LEFKOWITZ, R.J.: Elevated beta-adrenergic receptor number after chronic propranolol treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 720-725 (1977)
73. GODFRAND, T.: Cardiac glycoside receptors in the heart. *Biochem. Pharmac.* 24, 823-827 (1975)

74. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J.: Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump. *Nature* 265 , 165-166 (1977)
75. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J.: Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart Na^+/K^+ pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77 , 3067-3069 (1980)
76. GODFRAIND, T.: Stimulation and inhibition of the Na^+/K^+ -pump by cardiac glycosides. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/I Cardiac Glycosides. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 381-393 (1981)
77. GÖTHERT, M.: Vorkommen, Funktion und Bedeutung prä- und postsynaptischer Adrenozeptoren. In: *Kardiovaskuläre Rezeptoren. Neue pharmakologische und klinische Aspekte*. Hrsg.: P. Schölmerich, H.J. Holtmeier, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 63-74 (1986)
78. GOLDSTEIN, R.E., CORASH, L.C., TALLMANN, J.F., RAYMOND, C., HYDE, J., SMITH, C.C., CAPURRO, N.L., ANDERSON, J.C.: Shortened platelet survival time and enhanced heart rate responses after abrupt withdrawal of propranolol from normal subjects. *Am. J. Cardiol.* 47 , 115-122 (1981)
79. GOLF, S., LORSTAD, R., HANSSON, V.: β -adrenoceptor density and relative number of β -adrenoceptor subtypes in biopsies from human right atrial, left ventricular, and right ventricular myocard. *Cardiovasc. Res.* 19 , 636-641 (1985)
80. HAMER, J.: The paradox of the lack of the efficacy of digitalis in congestive heart failure with sinus rhythm. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 8 , 109-113 (1979)
81. HARARY, I., HOOVER, F., FARLEX, B.: The isolation and cultivation of rat heart cells. In *Methods in Enzymology*, Vol. 32. Hrsg.: S.P. Colowick, N.O. Kaplan. Academic Press, New York, 740-745 (1974)
82. HARDEN, T.K.: Agonist-induced desensitization of the β -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.* 35 , 5-31 (1983)
83. HEALY, G.M., PARKER, R.C.: An improved chemically defined basal medium (CMRL-1415) for newly explanted mouse embryo cells. *J. Cell. Biol.* 30 , 531-538 (1966)
84. HERKEN, H., NEUBERT, D., TIMMLER, R.: Die enzymatische N-Demethylierung durch Leber-Mikrosomen bei der Morphin-Gewöhnung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 237 , 319-333 (1959)
85. HERMSMEYER, K., ROBINSON, R.B.: High sensitivity of cultured cardiac muscle cells to autonomic agents. *Am. J. Physiol.* 233 , 172-179 (1977)
86. ISENBERG, G.: Contractility for isolated bovine ventricular myocytes is enhanced by intracellular injection of cardioactive glycosides. Evidence for an intracellular mode of action. In: *Cardiac glycoside receptors and positive inotropy. Evidence for more than one receptor?* Basic Res. Cardiol. (Suppl. Vol. 79). Hrsg.: E. Erdmann, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 56-71 (1984)
87. JACOBSON, G., BALDESSARINI, R.J., MANSCHRECK, T.: Tardive and withdrawal dyskinesia associated with haloperidol. *Am. J. Psychiatry* 131 , 910-913 (1974)

88. JAFFE, J.H.: Drug addiction and drug abuse. In: The pharmacological basis of therapeutics. Hrsg.: A. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad, Mac Millan Publishing Co., New York, 532-581 (1985)
89. JOHNSTON, G.D., McDEVITT, D.G.: Is maintenance digoxin necessary in patients with sinus rhythm; *Lancet* 8116 , 567-570 (1979)
90. JUST, H., MEINERTZ, T.H.: Überblick und Perspektiven. In: Kardiovaskuläre Rezeptoren. Neue pharmakologische und klinische Aspekte. Hrsg.: P. Schölmerich, H.J. Holtmeier, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 195-201 (1986)
91. KARLINER, J.S., SIMPSON, P.C., HONBO, N., WOLOSZYN, W.: Mechanisms and time course of beta₁ adrenoceptor desensitization in mammalian cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 20 , 221-228 (1986)
92. KARSTEN, F.H.: Mammalian myocardial cells. In: Tissue culture, methods and applications, Hrsg.: P.F. Kruse, M.K. Patterson, Academic Press, New York 72-81 (1973)
93. KAUFMANN, R., TRITTHART, H., RODENROTH, S., ROST, B.: Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen. *Pflügers Arch.* 311 , 25-49 (1969)
94. KAZAZOGLU, T., RENAUD, F.F., ROSSI, B., LAZDUNSKI, M.: Two classes of ouabain receptors in chick ventricular cardiac cells and their relation to (Na⁺+K⁺)-ATPase inhibition, intracellular Na⁺ accumulation, Ca²⁺ influx, and cardiotonic effect. *J. Biol. Chem.* 258 , 12163-12170 (1983)
95. KIM, D., BARRY, W.H., SMITH, T.W.: Kinetics of ouabain binding and changes in cellular sodium content, ⁴²K transport and contractile state during ouabain exposure in cultured chick ventricular cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 231 , 326-333 (1984)
96. KIM, D., MARSH, J.D., BARRY, W.H., SMITH, T.W.: Effects of growth in low potassium or ouabain on membrane Na,K-ATPase, cation transport and contractility in cultured chicken heart cells. *Circ. Res.* 55 , 39-48 (1984)
97. KIM, D., SMITH, T.W.: Effects of thyroid hormone on sodium pump sites, sodium content and contractile responses to cardiac glycosides in cultured chick ventricular cells. *J. Clin. Invest.* 74 , 1481-1488 (1984)
98. KIMELBERG, H.K., MAYHEW, E.: Cell growth and ouabain sensitive ⁸⁶Rb⁺-uptake and (Na⁺+K⁺)-ATPase activity in 3 T 3 and SV 40 transformed 3 T 3 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 455 , 865-875 (1976)
99. KLEITMAN, J.H., INGELS, N.B., DAUGHTERS, G., STINSON, E.B., ALDERMAN, E.L., GOLDMAN, R.H.: Left ventricular dynamics during long term digoxin treatment in patients with stable coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 41 , 937-942 (1978)
100. KOIDL, B., TRITTHART, H.A., ERKINGER, S.: Cultured embryonic chick heart cells: photometric measurement of the cell pulsation and the effect of calcium ions, electrical stimulation and temperature. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12 , 165-178 (1980)

101. KOIDL, B., TRITTHART, H.A.: The effects of ouabain on the electrical and mechanical activities of embryonic chick heart cells in culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12 , 663-673 (1980)
102. KRÄMER, B., KÜBLER, W.: Absetzphänomene nach chronischer β -Blockade. *Dtsch. Med. Wschr.* 109 , 465-471 (1984)
103. KU, D.D., AKERA, T., BRODY, T., WEAVER, L.C.: Chronic digoxin treatment on canine myocardial Na^+ , K^+ -ATPase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 301 , 39-47 (1977)
104. KURZ, H., NEUMANN, H.G., FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Allgemeine Pharmakologie. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Hrsg.: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. Bibliographisches Institut, Mannheim Wien Zürich, 1-85 (1983)
105. LANGER, G.A.: Effects of digitalis on myocardial ionic exchange. *Circulation* 46 , 180-187 (1972)
106. LANGER, G.A.: Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem. Pharmac.* 30 , 3261-3264 (1981)
107. LANGER, G.A.: The "sodium pump lag" revisited. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15 , 647-651 (1983)
108. LAU, Y.H., ROBINSON, R.B., ROSEN, R.R., BILEZIKIAN, J.P.: Subclassification of β -adrenergic receptors in cultured rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ. Res.* 47 , 41-48 (1980)
109. LEE, C.O., KANG, D.H., SOKOL, J.H., LEE, K.S.: Relation between intracellular Na ion activity and tension of sheep cardiac Purkinje fibres exposed to dihydro-ouabain. *Biophys. J.* 29 , 315-330 (1980)
110. LEE, D.C.S., JOHNSON, R.A., BINGHAM, J.B., LEAHY, M., DINSMORE, R.E., GOROLL, A.H., NEWELL, J.B., STRAUSS, H.W., HABER, E.: Heart failure in outpatients. A randomized trial of digoxin versus placebo. *N. Engl. J. Med.* 306 , 699-705 (1982)
111. LEVITZKI, A.: β -adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Phys. Rev.* 66 , 819-854 (1986)
112. LIEBERMAN, M., ADAM, W.J., BULLOCK, P.N.: The cultured heart cell: problems and prospects. In: *Methods in cell biology*, Vol. 21, Hrsg.: C.C. Harris, B.F. Trump, G.D. Stoner, Academic Press, New York, 187-202 (1980)
113. LIMAS, C.J., LIMAS, C.: Rapid recovery of cardiac β -adrenergic receptors after isoproterenol-induced "down-regulation". *Circ. Res.* 55 , 524-531 (1984)
114. LINDSAY, R., PARKER, J.W.L.: Rat hepatic sodium plus potassium ion-dependent adenosine triphosphatase after treatment with digoxin and thyroxine. *Clin. Science Mol. Med.* 50 , 329-332 (1976)
115. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 , 265-275 (1951)
116. LÜLLMANN, H., PETERS, T.H.: Influence of cardiac glycosides on cell membrane. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/1 Cardiac Glycosides, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 395-406 (1981)

117. LÜLLMANN, H., PETERS, T.H., PRILLWITZ, H.H., ZIEGLER, A.: Cardiac glycosides with different effects in the heart. In: Cardiac glycoside receptors and positive inotropy. Evidence for more than one receptor. Basic Res. Cardiol. (Suppl.Vol. 79). Hrsg.: E. Erdmann, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 93-101 (1984)
118. MARSH, J.D., BARRY, W.H.: Desensitization to the inotropic effect of isoproterenol in cultured ventricular cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 223 , 60-67 (1982)
119. MARSH, J.D.: The cultured heart cell: a useful model for physiological and biochemical investigation. Int. J. Cardiol. 3 , 465-468 (1983)
120. MARSH, J.D., SMITH, T.W.: Receptors for β -adrenergic agonists in cultured chick ventricular cells. Mol. Pharmacol. 27 , 10-18 (1984)
121. MARSH, J.D., LACHANCE, D., KIM, D.: Mechanisms of β -adrenergic receptor regulation in cultured chick heart cells. Circ. Res. 57 , 171-181 (1985)
122. MARVIN, W.J., ROBINSON, R.B., HERMSMEYER, K.: Correlation of function and morphology of neonatal and embryonic chick cultured cardiac and vascular muscle cells. Circ. Res. 45 , 528-540 (1979)
123. MASON, D.T., AWAN, N.A.: Recent advances in digitalis research. Am. J. Cardiol. 43 , 1056-1059 (1979)
124. McCALL, D.: Cation exchange and glycoside binding in cultured rat heart cells. Am. J. Physiol. 236 , C87-C95 (1979)
125. McDONALD, T.F., DeHAAN, R.L.: Ion levels and membrane potentials in chick heart tissue and cultured cells. J. Gen. Physiol. 61 , 89-109 (1973)
126. MIDDEKE, M.: β -Adrenozeptoren bei der essentiellen Hypertonie und unter antihypertensiver Therapie. In: Kardiovaskuläre Rezeptoren. Neue pharmakologische und klinische Aspekte. Hrsg.: P. Schöllerich, H.J. Holtmeier, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 156-160 (1986)
127. MILLER, R.R., OLSON, H.G., AMSTERDAM, E.A., MASON, D.T.: Propranolol withdrawal rebound phenomenon. N. Engl. J. Med. 293 , 416-418 (1975)
128. MOLINOFF, P.B., AARONS, R.D.: Effects of drugs on β -adrenergic receptors on human lymphocytes. J. Cardiovasc. Pharmacol. 5 , 63-67 (1983)
129. MÜGGE, A., REUPCKE, C., SCHOLZ, H.: Increased myocardial β_1 -adrenoceptor density in rats chronically treated with propranolol. Eur. J. Pharmacol. 112 , 249-252 (1985)
130. NATTEL, S., RANGNO, R.E., VAN LOON, G.: Mechanism of propranolol withdrawal phenomena. Circulation 59 , 1158-1164 (1979)
131. NAYLER, W., NOACK, E.A.: Influence of cardiac glycosides on electrolyte exchange and content in cardiac muscle cells. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 56/I Cardiac Glycosides, 407-436 (1981)
132. NECHAY, B.R., JACKSON, R.E., ZIEGLER, M.G., NELDON, S.L., THOMPSON, J.D.: Effects of chronic digitalization on cardiac and renal Na^+/K^+ -dependent adenosine triphosphate activity and circulating catecholamines in the dog. Circ. Res. 49 , 655-660 (1981)
133. NEEDLEMAN, P., JOHNSON, E.M.: Mechanism of tolerance development to organic nitrates. J. Pharm. Exp. Ther. 184 , 709-715 (1973)

134. NICKOLS, G.A., BROOKER, G.: Potentiation of cholera toxin-simulated cyclic AMP production in cultured cells by inhibitors of RNA and protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 255 , 23-26 (1980)
135. NOBLE, D.: Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. *Cardiovasc. Res.* 14 , 495-514 (1980)
136. OKARMA, T.B., TRAMELL, P., KALMAN, S.M.: The surface interaction between digoxin and cultured heart cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 183 , 559-576 (1972)
137. OKAMOTO, M., BOISSE, N.R., ROSENBERG, H.C., ROSEN, R.: Characteristics of functional tolerance during barbiturate physical dependency production. *J. Pharm. Exp. Ther.* 207 , 906-915 (1978)
138. PLUTO, R., BÜRGER, P., WEICKER, H.: Die physiologische Variabilität der Plasma-Katecholamine. *Klin. Wochenschr.* 64 , 625-632 (1986)
139. PODRID, P.J., LOWN, B.: Use of beta-adrenergic blocking agents for cardiac arrhythmias. In: *Beta-Blockers in the Treatment of Cardiovascular Disease*. Hrsg.: J.B. Kostis, E.A. De Felice, Raven Press, New York, 121-154 (1984)
140. POLLACK, L.R., TATE, E.H., COOK, J.S.: Na^+ , K^+ -ATPase in HeLa cells after prolonged growth in low K^+ or ouabain. *J. Cell. Physiol.* 106 , 85-97 (1981)
141. PORTENIER, M., HERTEL, C., MÜLLER, P., STAEHELIN, M.: Some unique properties of CGP 12177. *J. Rec. Res.* 4 , 103-111 (1984)
142. PORZIG, H., BECKER, C., REUTER, H.: Competitive and non-competitive interactions between specific ligands and beta-adrenoceptors in living cardiac cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 321 , 89-99 (1982)
143. PRITCHARD, B.N.C., TOMLINSON, B., WALDEN, R.J., BHATTACHARJEE, P.: The β -adrenergic blockade withdrawal phenomenon. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5 , 56-62 (1983)
144. RANGNO, R.E.: Beta blocker withdrawal syndrome. In: *Beta Blockers in the Treatment of Cardiovascular Disease*. Hrsg.: J.B. Kostis, E.A. De Felice, Raven Press, New York, 275-300 (1984)
145. REITHMANN, C., THOMSCHE, A., WERDAN, K.: The role of endogenous noradrenaline in the beta-blocker withdrawal phenomenon - studies with cultured heart cells. *Klin. Wochenschr.* 65 , Heft 7 (1987)
146. REPKE, K.R.H., PORTIUS, H.J.: Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. *Experientia* 19 , 1-7 (1963)
147. REPKE, K.R.H., HERRMANN, I., PORTIUS, H.J.: Interaction of cardiac glycosides and NaK -ATPase is regulated by effector-controlled equilibrium between two limit enzyme conformers. *Biochem. Pharmacol.* 33 , 2089-2099 (1984)
148. ROSEN, M.R., WIT, A.L., HOFFMAN, B.F.: Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. IV. Cardiac antiarrhythmic and toxic effects of digitalis. *Am. Heart J.* 89 , 391-399 (1975)
149. ROSS, P.J., SHERIDAN, D.J., HENDERSON, A.H.: Adrenergic hypersensitivity after beta-blocker withdrawal. *Br. Heart J.* 45 , 637-642 (1981)
150. SALOMON, A., LONDOS, C., ROBBELL, M.: A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58 , 541-548 (1974)

151. SCATCHARD, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 , 660-672 (1949)
152. SCHANNE, O.F., EKALY, G.: Explanted cardiac cells: a model to study drug actions? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59 , 443-467 (1981)
153. SCHMITZ, P.J., WALKER, G.A., BARKER, W.M., STOLL, R.W.: Evaluation of catecholamine hypertensitivity after acute withdrawal of carteolol and propranolol. *Clin. Res.* 29 , 23A (1981)
154. SCHWARTZ, A., WHITMER, K., GRUPP, G., GRUPP, I., ADAMS, R.J., LEE, S.W.: Mechanism of action of digitalis: is the Na,K-ATPase the pharmacological receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 252 , 253-271 (1982)
155. SERAYDARIAN, M.W., HARARY, I., SATO, E.: In vitro studies of beating heart cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 162 , 414-423 (1968)
156. SHATAN, C.: Withdrawal symptoms after abrupt termination of imipramine. *Can. Psychiatr. Assoc. J.* 2 , 150-157 (1966)
157. SIBLEY, D.R., LEFKOWITZ, R.J.: Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* 317 , 124-129 (1985)
158. SKOU, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes. *Physiol. Rev.* 45 , 596-617 (1965)
159. SLOME, R.: Withdrawal of propranolol and myocardial infarction. *Lancet* 1 , 156 (1973)
160. SMITH, T.W., HABER, E.: Digitalis. *N. Engl. J. Med.* 289 , 945-952, 1010-1015, 1063-1072, 1125-1129 (1973)
161. SMITH, T.W., KIM, D., BARRY, W.H.: Studies of the inotropic mechanisms of cardiac glycosides in cultured heart cells. *Bas. Res. Cardiol. (Suppl. Vol. 79)* , 140-146 (1984)
162. SOKOLOFF, N.M., SPIELMAN, S.R., GREENSPAN, A.M., RAE, A.P., PORTER, R.S., LOWENTHAL, D.F., HAKKI, A.H., ISKANDRIAN, A.S., KAY, H.R., HOROWITZ, L.N.: Plasma norepinephrine in exercise-induced ventricular tachycardia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 8 , 11-17 (1986)
163. SPERELAKIS, N., LEE, E.C.: Characterization of $(\text{Na}^+ \text{K}^+)$ -ATPase isolated from embryonic chick hearts and cultured chick heart cells. *Biochim. Biophys. Acta* 233 , 562-579 (1971)
164. SPERELAKIS, N.: Changes in membrane electrical properties during development of the heart. In: *The slow inward current and cardiac arrhythmias*. Hrsg.: D.P. Zipes, J.C. Bailey, Marinus Nijhoff Publishers, The Hague Boston London, 221-262 (1980)
165. SPERELAKIS, N., PAPPANO, A.J.: Physiology and pharmacology of developing heart cells. *Pharmacology and Therapeutics* 22 , 1-39 (1983)
166. STAHELIN, M., SIMONS, P., JAEGGI, K., WIGGER, N.: CGP 12177. A hydrophilic β -adrenergic receptor radioligand reveals high affinity binding of agonists to intact cells. *J. Biol. Chem.* 258 , 3496-3502 (1983)
167. STAIGER, J., SPÄTH, J., DICKHUTH, H.H., KEUL, J.: Influence of low-dose digitoxin (0.07mg) on left ventricular contractility in chronic heart failure (stages II-III). *Z. Kardiol.* 72 , 448-455 (1983)

168. STENE-LARSEN, G., ASK, J.A., HELLE, K.B., FIN, R.: Activation of cardiac β_2 -adrenoceptors in the human heart. *Am. J. Cardiol.* 57 , 7F-10F (1986)
169. STILES, G.L., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.: β -adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol. Rev.* 64 , 661-743 (1984)
170. SZECSI, E., KOHLSCHUTTER, S., SCHIESS, W., LANG, E.: Abrupt withdrawal of pindolol or metoprolol after chronic therapy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 13 , 353S-357S (1982)
171. TAGGART, A.J., JOHNSTON, G.D., McDEVITT, D.G.: Digoxin withdrawal after cardiac failure in patients with sinus rhythm. *J. Cardiovasc. Pharmac.* 5 , 229-234 (1983)
172. TOVEY, K.C., OLDHAM, K.G., WHEELAN, J.A.M.: A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chem. Acta* 56 , 221-234 (1974)
173. TSAI, J.S., CHEN, A.: Effect of L-triiodothyronine on $(-)^3\text{H}$ -dihydroalprenolol binding and cyclic AMP response to $(-)$ -adrenaline in cultured heart cells. *Nature*, 275 , 138-140 (1978)
174. VASALLE, M., LEE, C.O.: The relationship among intracellular sodium activity, calcium, and strophanthidin inotropy in canine cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Physiol.* 83 , 287-307 (1984)
175. VOGEL, R., FRISCHKNECHT, J., STEELE, P.: Short- and longterm effects of digitalis on resting and post hand grip hemodynamics in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 40 , 171-176 (1977)
176. VORNANEN, M.: Characterization of contractions in enzymatically isolated rat ventricular myocytes: effects of ouabain and rubidium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62 , 253-258 (1984)
177. WALDECK, B., JEPSSON, A.B., WIDMARK, E.: Partial agonism and functional selectivity: a study on β -adrenoceptor mediated effects in tracheal, cardiac and skeletal muscle. *Acta pharmacol. et toxicol.* 58 , 209-218 (1986)
178. WALLICK, E.T., LANE, L.K., SCHWARTZ, A.: Biochemical mechanism of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 41 , 397-411 (1979)
179. WALLUKAT, G., WOLLENBERGER, A.: Differential α - and β -adrenergic responsiveness of beating rat heart myocytes after stationary and non-stationary cultivation. *Acta biol. germ.* 39 , K7-K13 (1980)
180. WALLUKAT, G., WOLLENBERGER, A.: Modulation of β_2 -adrenergic receptor function in cultured rat heart cells by L(+)-lactate and pyruvate. In: Molecular basis of neural function. Abstracts of the Sixth General Meeting of the European Society for Neurochemistry. Hrsg.: S. Tuček, S. Stipek, F. Stastny, J. Krivanek, 165 (1986)
181. WARBANOW, W.: Die mechanische Aktivität kultivierter Herzzellen. Physiologische und pharmakologische Untersuchungen. Dissertation zur Promotion B und Erlangung des akad. Grades Dr. Sc. med., Berlin-Buch (1980)
182. WEINER, N.: Drugs that inhibit adrenergic nerves and block adrenergic receptors. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hrsg.: A. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad. Mac Millan Publishing Co., New York, 181-214 (1985)

183. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOZSIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells. Vanadate transport, intracellular binding and vanadate-induced changes in beating and in active cation flux. *Biochim. Biophys. Acta* 597, 364-383 (1980)
184. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., FISCHER, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H.: Stimulatory (insulin-mimetic) and inhibitory (ouabain-like) action of vanadate on potassium uptake and cellular sodium and potassium in heart cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 687, 79-93 (1982)
185. WERDAN, K., ZWISLER, B., WAGENKNECHT, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Quantitative correlation of cardiac glycoside binding to its receptor and inhibition of the sodium pump in chicken heart cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* 32, 757-760 (1983)
186. WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISLER, B., BROWN, L., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells - I. Characterization of one single class of high affinity receptors in heart muscle cells from chick embryos. *Biochem. Pharmacol.* 33, 55-70 (1984)
187. WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISLER, B., BROWN, L., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells - II. Characterization of a high affinity and a low affinity binding site in heart muscle cells from neonatal rats. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1873-1886 (1984)
188. WERDAN, K., SCHNEIDER, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Chronic exposure to low K^+ increases cardiac glycoside receptors in cultured cardiac cells: different responses of cardiac muscle and non muscle cells from chicken embryos. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1161-1164 (1984)
189. WERDAN, K., REITHMANN, C., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Chronic exposure to toxic but not to "therapeutic" concentrations of ouabain increases cardiac glycoside receptors in cardiac muscle cells from chicken embryos. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2337-2340 (1984)
190. WERDAN, K., REITHMANN, C., SCHNEIDER, G., ERDMANN, E.: Modulation of cardiac glycoside sensitivity of beating heart muscle cells in culture. In: *The sodium pump. Proceedings of the fourth international conference on Na,K-ATPase*, Cambridge UK. Hrsg.: J.C. Ellroy, I.M. Glynn, 679-683 (1985)
191. WERDAN, K., REITHMANN, C., ERDMANN, E.: Cardiac glycoside tolerance in cultured chicken heart muscle cells - a dose-dependent phenomenon. *Klin. Wochenschr.* 63, 1253-1264 (1985)
192. WERDAN, K., REITHMANN, C., ERDMANN, E.: Attenuation of cardiac glycoside effects during long term-treatment. In: *Cardiac Glycosides 1985-1985*. Hrsg.: E. Erdmann, K. Greeff, J.C. Skou, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 437-445 (1986)
193. WERDAN, K., REITHMANN, C., ERDMANN, E.: Die Variabilität von Herzglykosidrezeptoren an Herzmuskelzellen. In: *Kardiovaskuläre Rezeptoren. Neue pharmakologische und klinische Aspekte*. Hrsg.: P. Schölmerich, H.J. Holtmeier, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 11-26 (1986)
194. WERDAN, K., REITHMANN, C.: Neonatale und embryonale Herzmuskelzellen als Myokardmodell - Regulation kardialer Rezeptoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, im Druck

195. WERDAN, K., ERDMANN, E.: Embryonic and neonatal heart muscle cells - preparation and culture; modification of transport activity. In: Methods in Enzymology - Biomembranes, Part M: Biological Transport Eukaryotic, Cellular and Subcellular Transport; in Vorbereitung
196. WESTFALL, D.P.: Adrenoceptor antagonists. In: Modern Pharmacology. Hrsg.: C.R. Craig, R.E. Stitzel, Little, Brown and Company, Boston, 141-156 (1982)
197. WHITTACKER, J., HAWKINS, M., SWAMINATHAN, R.: Changes in erythrocyte sodium, sodium transport and ^3H ouabain binding capacity during digoxin administration in the pig. Life Sci. 32, 747-754 (1983)
198. WHITTACKER, J., SWAMINATHAN, R.: The effect of chronic digoxin administration on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity in the pig. IRCS Med. Sci. 11, 846 (1983)
199. WILSON, D.F., WATSON, O.F., PEEL, J.S., TURNER, A.S.: Trasacor in angina pectoris: a double blind trial. Brit. med. J. 2, 155-157 (1969)
200. YAMAMOTO, S., AKERA, T., BRODY, T.: Sodium influx rate and ouabain-sensitive rubidium uptake in isolated pig atria. Biochim. Biophys. Acta 555, 270-284 (1979)
201. ZERKOWSKI, H.R., IKEZONO, K., ROHM, N., REIDEMEISTER, J.C., BRODDE, O.E.: Human myocardial β -adrenoceptors: demonstration of both β_1 - and β_2 -adrenoceptors mediating contractile responses to β -agonists on the isolated right atrium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 332, 142-147 (1986)

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Werdan, der mich in die Grundzüge wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens eingewiesen und durch sein unermüdliches Interesse diese Arbeit entscheidend unterstützt hat, ebenso Herrn Prof. Dr. E. Erdmann für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit. Großen Dank schulde ich auch Frä. A. Thomschke für ihre engagierte Mitarbeit.

Danken möchte ich auch Herrn H. Schöffmann (Institut für Klinische Chemie der Universität München, Klinikum Großhadern) für die Unterstützung bei der Etablierung der beschriebenen Kontraktionskammer und Herrn Dr. S. Braun (Institut für Klinische Chemie), der die Noradrenalin-Messung im Zellkulturmedium durchführte.

LEBENS LAUF

Am 14. Dezember 1959 wurde ich in Köln als zweites Kind des Notars

Dr. Christoph Reithmann und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Weber, geboren.

- | | |
|---------------|---|
| 1966 | Volksschule Rottenburg (Ndb.) |
| 1966-1970 | Volksschule Wolfratshausen (Obb.) |
| 1970-1979 | Gymnasium Icking (Obb.) |
| 1979 | Abitur |
| 1979-1986 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München |
| 1983-1986 | Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-
Universität München, Klinikum Großhadern |
| 1985-1986 | Im Rahmen des Praktischen Jahres Ausbildung an der Chirurgischen
Abteilung der Krankenanstalt des Dritten Ordens München-Nymphenburg,
an der Kinderklinik der Universität München im Dr. v. Haunerschen
Kinderspital und an der Medizinischen Klinik I im Klinikum
Großhadern der Universität München |
| 1985 | heiratete ich die Chemisch Technische Assistentin
Hannelore Schäffler |
| Frühjahr 1986 | Ablegen des 3. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung und Approbation |

Seit Juli 1986 arbeite ich als wehrpflichtiger Stabsarzt am Institut für

Pharmakologie und Toxikologie der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens

der Bundeswehr in München-Hochbrück.

